

## Trabajo Fin de Máster

Master Biología Molecular y Celular

# **CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES INMUNOSUPRESORAS EN UN MODELO MURINO DE TUMORIGÉNESIS**

Autora:

**Nadia Sanz Carrasco**

Director:

**Juan Ignacio Aguiló Anento**

**Grupo Genética de Micobacterias**

**Facultad de Medicina**

**2020**

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
2.1. Características fenotípicas y moleculares de las MDSC .....	5
2.2. Características funcionales de las MDSC .....	7
2.3. Actividad antitumoral del BCG .....	8
<b>3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
4.1. Líneas celulares utilizadas .....	12
4.2. Cultivo celular de B16F10 y KC8.1 .....	12
4.3. Generación de suspensiones celulares a partir de órganos de ratón .....	12
4.3.1. Suspensión celular de bazo.....	13
4.3.2. Suspensión celular de ganglios linfáticos.....	13
4.3.3. Suspensión celular de pulmón.....	14
4.3.4. Suspensión celular de tumores subcutáneos.....	14
4.4. Separación magnética .....	14
4.5. Ensayos in vitro con células de ratón .....	15
4.5.1. Estimulación y proliferación de esplenocitos.....	15
4.6. Marcaje con anticuepos .....	16
4.7. Análisis mediante citometría de flujo.....	17
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
5.1. Identificación y caracterización de MDSCs en ratones inoculados con tumores ..	18
5.1.1. Ensayo con tumor KC8.1.....	19
5.1.2. Ensayo con tumor B16F10.....	22

5.2. Puesta a punto de ensayos de proliferación de células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .....	26
5.2.1. Marcador de proliferación Cell Tracker Violet BMQC Dye.....	26
5.2.2. Marcador de proliferación Cell proliferation Dye eFluor 670.....	29
5.2.3. Marcador de proliferación Cell Trace Violet .....	34
5.3. Estudio de la capacidad inmunosupresora de MDSCs y el efecto de BCG sobre ellas .....	36
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>47</b>

## 1. RESUMEN

Las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) son una población heterogénea de células que se expanden durante el cáncer, la inflamación y la infección y que contribuyen a una red inmunosupresora que impulsa un escape del cáncer al inhabilitar la inmunidad de las células T. Los mecanismos por los cuales las MDSC establecen un ambiente inmunosupresor es, entre otros, a través de especies reactivas de oxígeno (ROS), producción de óxido nítrico (NO), y expresión de arginasa-1. La acumulación de estas células ocurre tanto en ganglios linfáticos como en bazo y tumor y depende de señales como los factores de estimulación de colonias producidas por tumores o el estroma de la médula ósea.

En el contexto del cáncer, la inmunoterapia con *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) ha sido ampliamente empleada ya que induce la expansión de las células T que luego se trasladan al microambiente del tumor y conducen a una mayor eliminación de éste.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la capacidad inmunosupresora de las MDSCs en esplenocitos murinos y de cómo la vacunación con BCG podría revertir su fenotipo y función en estos mismos ratones.

Este trabajo revisa la caracterización de las distintas subpoblaciones de MDSC en dos modelos murinos tumorigénicos donde se compararan en diferentes órganos con un modelo sano (control). Además, se han optimizado ensayos de proliferación de esplenocitos para, posteriormente, estudiar la capacidad inmunosupresora de las MDSCs a través de cocultivos con bazos y tumores. Finalmente se estudió si BCG podría influir sobre ellas reeducando el sistema inmune editado por los tumores.

## **ABSTRACT**

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are a heterogeneous population of cells that expand during cancer, inflammation, and infection and contribute to an immunosuppressive network that drives an escape from cancer by disabling T-cell immunity. Among other mechanisms, MDSC establish an immunosuppressive environment, through reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) production, and arginase-1 expression. The accumulation of these cells occurs in lymph nodes as well as in spleen and tumor and depends on signals such as colony-stimulating factors produced by tumors or the stroma of the bone marrow.

In the context of cancer, immunotherapy with *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) has been widely used as it induces the expansion of T cells which then move into the tumor microenvironment and lead to further elimination of the tumor.

The aim of this work is to study the immunosuppressive capacity of MDSC in murine splenocytes and how BCG vaccination could reverse their phenotype and function in these mice.

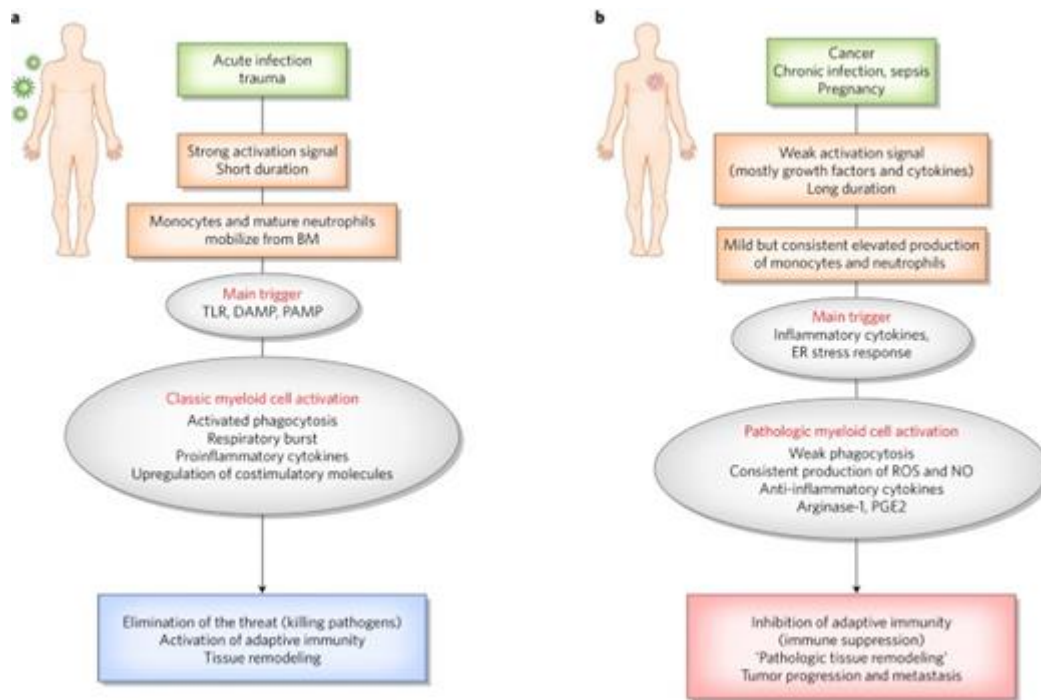
This work reviews the characterization of the different MDSC subpopulations in two tumorigenic murine models where they will be compared in different organs with a healthy model (control). In addition, splenocyte proliferation assays have been optimized to subsequently study the immunosuppressive capacity of MDSC through cocultures with spleen and tumor cells. Finally, it was studied whether BCG could influence them by re-educating the immune system edited by tumors.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las células mieloides derivan de la médula ósea y son una población muy diversa. Las células mieloides mononucleares incluyen macrófagos, células dendríticas (CD) y monocitos, que en condiciones adversas como la inflamación se diferencian en los tejidos a macrófagos. Las células mieloides granulocíticas incluyen poblaciones de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), eosinófilos, basófilos y mastocitos. [1]

La mielopoyesis en respuesta a estímulos patógenos es un mecanismo fundamental que protege al huésped. Se manifiesta en gran medida en la expansión de neutrófilos y monocitos activados. La activación clásica de estas células tiene lugar como respuesta a señales que, generalmente, vienen en forma de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a peligros (DAMP). Esta activación es relativamente de corta duración y produce fagocitosis y liberación de citocinas proinflamatorias que termina al cesar los estímulos. Sin embargo, durante una inflamación no resuelta, como una infección persistente, cáncer y otras afecciones crónicas, la naturaleza de las señales que activan las células mieloides difiere. Las células mieloides generadas en estas condiciones muestran un fenotipo y una morfología inmaduros, una actividad fagocítica débil, un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la producción de óxido nítrico (NO), y alta expresión de arginasa, prostaglandina E2, así como de citoquinas inflamatorias. Este estado de activación no conduce a la eliminación de la amenaza o activación de la inmunidad, sino a la inhibición de la inmunidad adaptativa (supresión inmunitaria) y al apoyo de la progresión tumoral y la metástasis. (fig.1)[2]

Originalmente estas células mieloides anormales se describieron como células de veto, células nulas o células supresoras naturales (NS) y más tarde se demostró su actividad supresora en linfocitos T. En los últimos años se introdujo el concepto de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) para reflejar la naturaleza anormal de la mielopoyesis en el cáncer. [2,4]



**Figura 1. Activación patológica de MDSC [3].** A. A partir de señales como DAMP o PAMP se movilizan monocitos y neutrófilos de la médula ósea. Esta respuesta da lugar a una activación clásica y regular que llevará a la eliminación del daño. B. Debido a la presencia de citocinas y factores de crecimiento las células experimentan una expansión y activación continua. Las citocinas inflamatorias contribuyen a una activación patológica de las células mieloides, dando lugar a producción de ROS, NO y ARG-1 entre otras.

La forma mediante el cual los tumores revierten las defensas del huésped es el establecimiento de una estructura integrada alrededor de las células tumorales que conforman el microambiente tumoral (TME). [5,6]

La acumulación de MDSCs depende de dos grupos de señales interconectadas del TME. El primer grupo de señales es importante para la expansión de poblaciones de células mieloides inmaduras, mientras que el segundo grupo es responsable de su activación patológica. El primer grupo es impulsado por factores producidos por tumores o el estroma de la médula ósea en respuesta a la infección e inflamación crónica, e incluye distintos factores de estimulación de colonias (GM-CSF, M-CSF...). El segundo grupo de señales está mediado por citocinas inflamatorias y PAMPs, que incluyen IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13 y factor de necrosis tumoral (TNF) principalmente. Mediadores proinflamatorios adicionales como el leucotrieno D4 (LTD4) y prostaglandina E2 (PGE2) también pueden afectar a la diferenciación de estas células. [2,4]

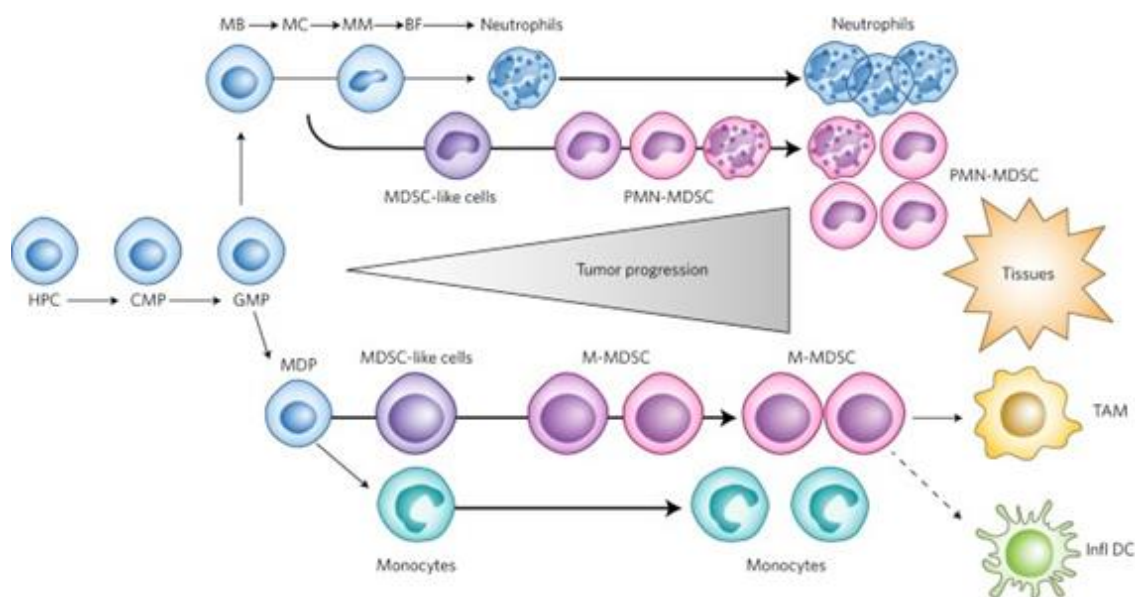
Por tanto se asocia con la secreción tumoral de citocinas y quimiocinas la inducción de la proliferación, acumulación e infiltración tumoral de células mieloides inmaduras. Las citocinas y quimiocinas plasmáticas difieren entre hospedadores portadores de tumores tanto en humanos como en ratones.

Los cambios macroambientales, como los tipos y la duración de las citocinas y quimiocinas circulantes, tienen un papel crucial en la regulación de las células infiltrantes en el microambiente tumoral. De manera que la patobiología de las MDSC está regulada por el macroambiente a través de la mielopoyesis alterada y la diferenciación en asociación con quimiocinas y factores de crecimiento hematopoyético derivados de tumores. [4,8]

## **2.1 Características fenotípicas y moleculares de las MDSC**

El campo de la investigación de MDSC aún es inmaduro y es difícil distinguir estas células de los neutrófilos y monocitos [9]. De forma general las MDSCs incluyen subpoblaciones denominadas granulocíticas o polimorfonucleares (PMN-MDSC), siendo fenotípica y morfológicamente similares a los neutrófilos y, monocíticas (M-MDSC), fenotípica y morfológicamente similares a los monocitos. En los tejidos tumorales, las M-MDSC se diferencian rápidamente en macrófagos asociados a tumores (TAM) y CD inflamatorias (fig.2). Éstas juegan un papel importante en la generación de tolerancia tumoral. Las distintas señales que generan los tumores favorecen la polarización de estos macrófagos en un fenotipo regulador o M2, anulando la respuesta antitumoral. Por el contrario los macrófagos que polarizan hacia un fenotipo M1 son capaces de atacar directamente a las células tumorales. Por lo tanto, los macrófagos M1 y M2 se han denominados como antitumorales y protumorales respectivamente. [4,10]





**Figura 2. Diferenciación de MDSC [3]** .Tanto neutrófilos como monocitos se diferencian en la médula ósea a partir de células progenitoras hematopoyéticas (HPC), progenitores mieloides comunes (CMP) y progenitores granulocitos-macrófagos (GMP). La diferenciación de neutrófilos progresa a través de mieloblastos (MB) mielocitos (MC), metamielocitos (MM) y formas de banda (BF). Sin embargo, los monocitos se originan a partir de monocitos/macrófagos y precursores de células dendríticas (MDP).En condiciones patológicas estas poblaciones se expanden y convierten en MDSC inmunosupresoras. En etapas tempranas aún no tienen capacidad inmunosupresora y se denominan células similares a MDSC. En individuos con cáncer estas células se activan y se acumulan durante la progresión tumoral. Las M-MDSC en tumores se diferencian rápidamente en macrófagos asociados a tumores (TAM) y células dendríticas inflamatorias.

En ratones, las MDSCs se han descrito principalmente en médula ósea, sangre periférica, bazo, pulmón o en diferentes tumores y constan de dos subpoblaciones principales:  $CD11b^{+} Ly6G^{+}$  en el caso de PMN-MDSC y,  $CD11b^{+} Ly6C^{+}$  en el caso de M-MDSC. Fenotípicamente, las M-MDSC se pueden separar fácilmente de las TAM, ya que éstas tienen una alta expresión de F4 / 80 y una expresión baja de Ly6C. [11]

En humanos, estas células se describieron en sangre y tumores de distintos órganos. En el caso de las PMN-MDSC la caracterización fenotípica es:  $CD11b^{+} CD14^{-} CD15^{+}$  o  $CD11b^{+} CD14^{-} CD66b^{+}$  y,  $CD11b^{+} CD14^{+} HLA-DR^{-} CD15^{-}$  para las M-MDSC. [1,12]

La heterogeneidad de las MDSCs deriva de los complejos patrones de expresión de sus marcadores de superficie y ubicaciones. Además de los perfiles de expresión de

proteínas, las MDSCs se distinguen de los neutrófilos y monocitos por la actividad y expresión de moléculas específicas. Además, la regulación de STAT3 es un sello distintivo de las MDSC, ya que este factor de transcripción está directamente implicado en la acumulación de MDSC en humanos y ratones. [13]

## **2.2 Características funcionales de las MDSC**

La supresión inmune es una característica principal de las MDSC que les permite distinguirse de los monocitos y neutrófilos en la sangre periférica en humanos y en ratones. Aunque las MDSC están implicadas en la supresión de diferentes células del sistema inmune, su objetivo principal son las células T. Las PMN-MDSC suprimen principalmente las respuestas al producir ROS mientras que las M-MDSC producen altas cantidades de NO, Arg-1 y citocinas inmunosupresoras como IL-10. [1]

Además de los mecanismos inmunosupresores, las MDSC promueven la progresión tumoral al afectar la remodelación del microambiente tumoral (TME) y la angiogénesis tumoral, mediante la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF,) factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y metalopeptidasa 9 de matriz (MMP9). Las MDSC se han implicado en la formación de nichos premetastásicos y en la promoción de metástasis al infiltrar tumores primarios. La creciente evidencia experimental indica que las MDSC son los determinantes clave de la formación del nicho premetastásicos, aunque otras células inmunes, como neutrófilos, macrófagos y T reguladores también participan en dicha formación. [2]

La tolerancia inmunológica tumoral es, por tanto, un paso importante para la progresión del cáncer. La formación de MDSCs es una estrategia de las células tumorales para superar las respuestas antitumorales. [1,4]

### 2. 3 Actividad antitumoral de BCG.

Bacillus Calmette-Guérin (BCG) es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* desarrollada originalmente como vacuna contra la tuberculosis. La idea de que las micobacterias podrían ser útiles como terapia para el cáncer fue sugerida por Raymond Pearl, quien observó en un estudio que el cáncer era menos común en pacientes que tenían lesiones de tuberculosis activa. Basándose en principios similares, Lloyd Old demostró que los ratones infectados por vía intravenosa con BCG eran más resistentes al trasplante de tumores [14]. Posteriormente, la inmunoterapia con BCG se utilizó para varios cánceres, incluidos la leucemia y el melanoma pero fue en 1976 cuando salió el primer informe de un uso exitoso de BCG en pacientes con cáncer de vejiga. Hasta la fecha, BCG sigue siendo la única inmunoterapia contra el cáncer aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos en 1990. [15]

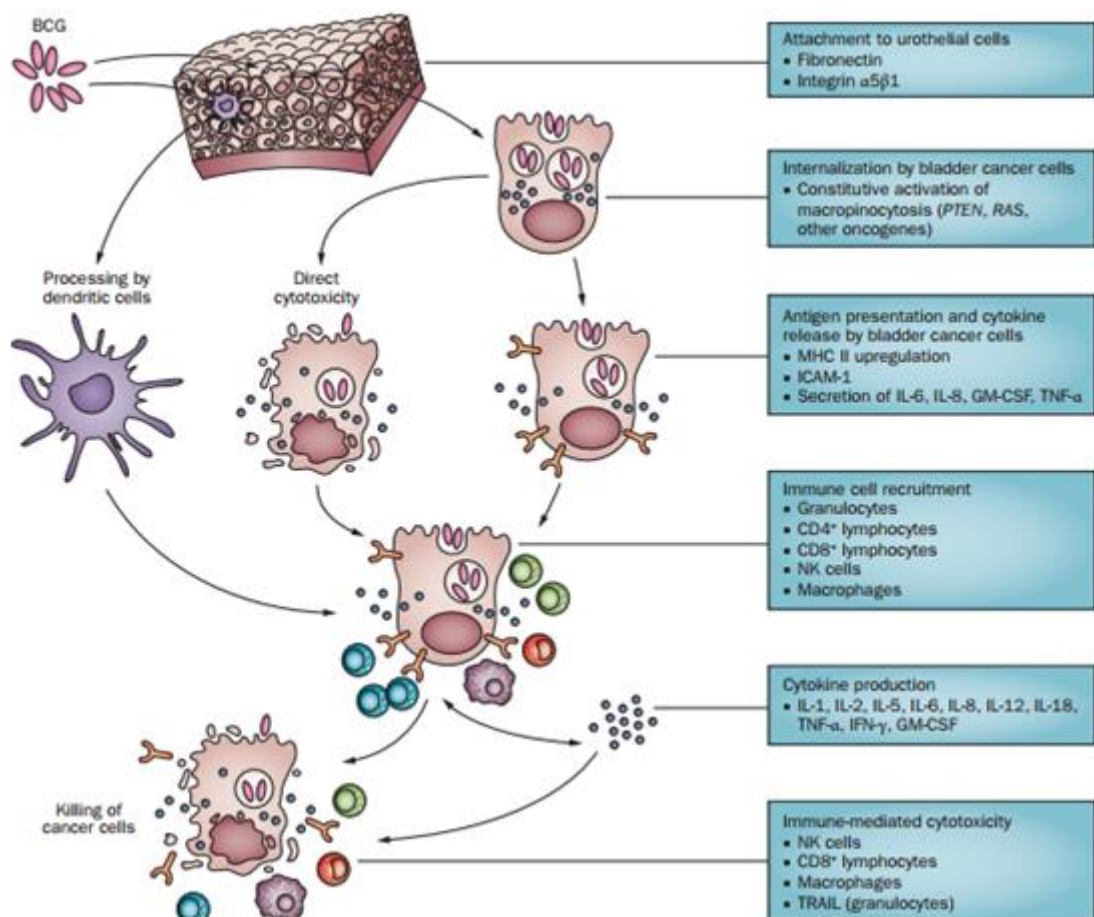
Su uso es eficaz para desencadenar la inflamación y provocar una inmunidad tumoral exitosa en pacientes con cáncer de vejiga, con una respuesta clínica del 50%-70% [16]. A las pocas horas de la administración de BCG, se puede detectar un aumento en el número de leucocitos en la orina. Estos leucocitos están formados principalmente por granulocitos y, en menor grado, por macrófagos.

También se pueden encontrar células T, en su mayoría CD4<sup>+</sup>, infiltrando la mucosa de la vejiga durante meses después de la terapia con BCG. Aunque predominan los linfocitos CD4<sup>+</sup>, se necesitan tanto linfocitos CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> para una terapia BCG eficaz. [14]

*Biot et al* mostró que BCG intravesical conducía a la expansión de las células T específicas de BCG en los ganglios linfáticos que luego se trasladaban al microambiente del tumor y conducían a una mayor eliminación de éste. Sobre la base de estos resultados, llegaron a la conclusión de que la activación de las células T específicas de BCG era esencial para la respuesta antitumoral resultante. [17,15]

Además, el empleo de BCG intravesical induce a las células uroteliales y presentadoras de antígenos a producir citocinas y quimiocinas que incluyen IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, IFN- $\gamma$ , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como las quimiocinas derivadas de macrófagos (MDC) lo que lleva al reclutamiento de componentes celulares adicionales de la respuesta inmune innata (fig.3). Además, numerosos estudios han demostrado la importancia crítica de la activación de la inmunidad adaptativa para la respuesta con BCG. [17,18]

La respuesta inmunitaria a BCG está precedida por una interacción entre BCG y las células uroteliales, que es esencial para lograr la actividad antitumoral (fig.3).



**Figura 3.** [14] Mecanismo de acción de BCG en el cáncer de vejiga. BCG vivo se adhiere al urotelio a través de fibronectina e integrina y es internalizada por las células tumorales de la vejiga. Esto provoca la secreción de citocinas, que junto con las células dendríticas, reclutan células inmunes que producirán citotoxicidad a las células tumorales mediante diversos mecanismos.

Paralelamente también se ha avanzado mucho en el descubrimiento de sus efectos sobre las células inmunitarias innatas. Un fenómeno denominado *inmunidad entrenada*, por el cual BCG induce cambios epigenéticos en monocitos y células NK que conducen a una respuesta inmune innata mejorada. [15]

### **3. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

En la actualidad, la mayor parte del conocimiento sobre las MDSC proviene de la investigación sobre inmunidad tumoral. Las células en este estado patológico de activación se pueden identificar funcional, bioquímica y, en cierta medida, fenotípicamente aunque ésta última aún continúa sin resolverse debido a los perfiles de marcadores fenotípicos dependientes de la heterogeneidad celular de esta población. [4]

En el grupo de investigación donde se ha desarrollado este Trabajo Final de Máster (TFM) se están llevando a cabo estudios sobre el posible uso de BCG y otras vacunas vivas atenuadas para el cáncer, más allá del cáncer de vejiga. A partir de esto, la hipótesis de este trabajo es que el efecto inflamatorio de la vacuna puede reeducar las células mieloides inmunosupresoras editadas por los tumores. Las MDSC son uno de los máximos exponentes de la edición inmunitaria por parte del tumor y por ello nos planteamos estudiarlas en el contexto del tratamiento.

Por ello, como punto de partida, este TFM se ha desarrollado para poner a punto los protocolos y caracterización de las MDSCs, y poderlas estudiar en el futuro. Para llevarlo a cabo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización inmunofenotípica de MDSC murinos a nivel de bazo y tumor principalmente.
- Puesta a punto de ensayos in vitro de proliferación en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> murinos.
- Estudio de la capacidad inhibitoria de MDSCs en esplenocitos murinos a nivel de bazo y tumor y ver el posible efecto de BCG sobre ellos.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Líneas celulares utilizadas**

En este trabajo se utilizaron células tumorales de melanoma de ratón B16F10 y adenocarcinoma de pulmón KC8.1, éstas últimas aisladas en el propio laboratorio.

Las células se pasaron un máximo de 4 veces y se analizaron para comprobar que estaban libres de micoplasmas. Se inocularon subcutáneamente 5-10 células KC8.1 o B16 F10 a ratones C57BL/6 y OT II.

### **4.2 Cultivo celular de B16F10 y KC8.1**

Las líneas celulares se descongelaron de alícuotas y se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), glutamax 2 mM y los antibióticos penicilina y estreptomicina 10 mg/ml. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5% y, tras 3 días de crecimiento se realizaron pases o subcultivos a otro flask para evitar la senescencia de las células. Tras el pase, se lavó con 10 ml de medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen) y se desechó todo el sobrenadante. A continuación, se añadieron 4 ml de tripsina para desprender las células adheridas al flask y se dejaron 5 minutos en la estufa a 37°C. Una vez en suspensión, se añadieron 4 ml de medio de cultivo con FBS para inhibir la acción de la tripsina, se trasladó el contenido a un falcon y se contó el número de células utilizando una cámara de Neubauer y la técnica de azul Tripán (1/100).

### **4.3. Generación de suspensiones celulares a partir de órganos de ratón.**

Los ensayos de proliferación, caracterización de MDSC y análisis de capacidad inhibitoria se realizaron a partir de suspensiones celulares de bazo, ganglios, pulmones y tumores en ratones sanos y con tumor. Para ello ratones sanos e inoculados con tumor B16F10 o KC8.1 fueron eutanasiados por personal específico y se extrajeron los órganos de interés.

#### 4.3.1 Suspensión celular de bazo

Se añadieron los bazos en pocillos de placas de 6 pocillos con 5 ml de medio de cultivo RPMI y 50 µl de Colagenasa D para favorecer la disgregación del tejido. Con ayuda de una tijera estéril se sacó el émbolo de una jeringa de 20 ml y con él se disgregaron los bazos para extraer sus células. La placa se incubó en la estufa a 37°C durante 15 minutos. Para separar los posibles restos de tejido, la suspensión resultante de los bazos se pasó a un falcon a través de un filtro Cell Strainer con un tamaño de poro de 70µm. Se lavó con 10 ml de medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen) y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de Red Blood cells Lysing buffer (Sigma) para lisar los eritrocitos y pasado 1 minuto se añadió medio RPMI para detener la reacción. La solución se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm y se resuspendió en 2 ml de Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (PBS) y Suero Fetal Bovino (FBS) al 2%. Finalmente en la placa de 96 pocillos de fondo curvo se añadió 100µl de la suspensión celular y se completó hasta 200µl con PBS + FBS al 2% donde se empezó el protocolo de marcaje.

#### 4.3.2 Suspensión celular de ganglios linfáticos

En pocillos de placas de 24 pocillos se añadieron los ganglios junto con 1-2 ml de medio RPMI. Al ser de menor tamaño se utilizó el émbolo de una jeringa de 1 ml para disgregar el tejido y extraer los linfocitos. La suspensión resultante fue traspasada a un falcon de 50 ml a partir de un filtro Cell Strainer de 70 µm y posteriormente lavada con 10 ml de medio RPMI. Finalmente se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm y el pellet se resuspendió en 500 µl de PBS + FBS al 2%.

Para llevar a cabo el marcaje posterior se añadió 100 µl de la suspensión celular y 200 µl de PBS+ FBS al 2% en pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo curvo.



#### 4.3.3 Suspensión celular de pulmón

El pulmón se introdujo en un tubo tipo C de MACS que contenía 5 ml de tampón HEPES (Gibco), 50  $\mu$ l de colagenasa D y 20  $\mu$ l de DNasa I para facilitar la disgregación del tejido. El tubo se colocó en Gentle MACS Dissociator y se programó en el protocolo "lung 01". La suspensión resultante se incubó 30 minutos en un baño de agua a 37°C para favorecer el efecto de las enzimas, agitándolo de vez en cuando. Para terminar de disgregar los tejidos, se volvió a colocar el tubo en el aparato MACS Dissociator con el protocolo "lung 02". A continuación, se traspasó el contenido del tubo a un falcon de 50 ml a través de un filtro de 70 $\mu$ m y se lavó con medio RPMI. El falcon se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm. Se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer de lisis de eritrocitos y se paró la reacción con 10 ml de RPMI. Para finalizar, se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se resuspendió en 1 ml de PBS + FBS al 2%.

Para llevar a cabo el posterior marcaje, se añadió 70  $\mu$ l de la suspensión de pulmón en una placa de 96 pocillos y se completó hasta 200  $\mu$ l con PBS+ FBS al 2%.

#### 4.3.4 Suspensión celular de tumores subcutáneos

Se colocó el tumor en una placa Petri con 5 ml de medio RPMI y se disgregó en trozos pequeños con ayuda de dos bisturís. Se pasó el contenido de la placa a un falcon de 50 ml y se añadió 5 ml de medio RPMI + 50  $\mu$ l de colagenasa D y 20  $\mu$ l de DNasa I. A continuación se incubó en el baño a 37°C durante 30-45 minutos. El contenido del falcón se volvió a pasar por un filtro de 70 $\mu$ l, se lavó con 10 ml de RPMI y se centrifugó 5 minutos a 1500rpm. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de PBS+ FBS al 2 % y se sembró 100  $\mu$ l a una placa de 96 pocillos de fondo curvo junto con 100  $\mu$ l de PBS + FBS al 2% para su posterior marcaje.

#### 4.4 Separación magnética de MDSC.

La separación magnética de PMN-MDSC se llevó a cabo a partir de suspensiones celulares de tumor y para ello fue necesario realizar unos pasos previos. Para empezar se contó el número de células utilizando azul Tripán y una cámara de Neubauer y así poder calcular el volumen de buffer de separación al que debían ser resuspendidas las células (600  $\mu$ l por 10<sup>6</sup> células). Posteriormente se preparó en un falcon, en

condiciones de esterilidad, el buffer de separación que contenía 0,5g de Suero de Albúmina Bovina (BSA) y 400 µl de EDTA.

Para llevar a cabo el proceso de separación se centrifugaron las suspensiones celulares a 1500 rpm durante 10 minutos y se resuspendió el pellet en 600 µl de buffer. A continuación, se añadieron 12 µl de anticuerpo Ly6G-PE y dejamos incubar a 4°C en oscuridad durante 10 minutos. Tras la primera incubación las muestras se lavaron con 5µl de buffer de separación y se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 600 µl de buffer separación. Se repitió el paso anterior y se añadió 160 µl de perlas magnéticas anti-PE que se unirán al anticuerpo primario Ly6G-PE; Se incubó 15 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo se volvió a lavar la muestra con 4 ml de buffer de separación, se centrifugó en las mismas condiciones nombradas anteriormente y el pellet se resuspendió en 500 µl de buffer. Colocamos la columna en el separador magnético MACS y dejamos pasar por ella 500µl de buffer de separación. A continuación se introdujeron las muestras y se lavó 3 veces con buffer. Para obtener la fracción de muestra marcada (PMN-MDSC) se quitó la columna del separador magnético y con ayuda de una jeringa apropiada se recogieron las células de interés.

Para terminar se llevó a cabo el conteo de células obtenidas por este método utilizando una cámara Neubauer y la técnica de azul Tripán.

#### **4.5 Ensayos in vitro con células de ratón**

##### **4.5.1 Estimulación y proliferación de esplenocitos**

Para poner a punto los ensayos de proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se utilizaron diferentes marcadores: Cell Tracker Violet BMQC Dye (Invitrogen), Cell proliferation Dye eFluor 670 (eBioscience) y CellTrace™ Violet (Molecular Probes). Las células fueron marcadas según las indicaciones del fabricante, utilizando 1 µl de solución de marcaje por cada 10<sup>6</sup> células/ml. Se incubaron durante 20 minutos a 37°C en oscuridad, después se agregó medio de cultivo y se incubaron durante 5 minutos adicionales. Se determinó la fluorescencia utilizando el citómetro de flujo.

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> Y CD8<sup>+</sup> derivados de ratones C57BL/6 marcados con cualquier kit de proliferación fueron previamente estimulados con los siguientes mitógenos: anti-CD3 y anti-CD28. En el caso de la estimulación con anticuerpo anti-CD3 se adsorbió previamente el anticuerpo monoclonal a la placa. Para ello se resuspendió el anticuerpo anti-CD3 a una concentración de 5µg/ml, se añadieron 50 µl por cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo curvo y se incubó durante 1 h a 37 °C. Antes de añadir las células a los pocillos con anti-CD3 inmovilizado se realizaron 3 lavados con PBS. El anticuerpo anti-CD28 se añadió al final del proceso a una concentración de 2µg/ml.

En el caso de los linfocitos CD4<sup>+</sup> derivados de ratones transgénicos OT II, la estimulación se llevó a cabo mediante ovoalbúmina (OVA) a una concentración de 2µg/ml. Estos ratones expresan el receptor de células T (TCR) de cadena alfa y beta de ratón que es específico para el péptido de ovoalbúmina 323-339. Esto da como resultado células T CD4<sup>+</sup> que reconocen principalmente los residuos de este péptido y demuestran una respuesta proliferativa dependiente de él. [19]

#### **4.6 Marcaje con anticuerpos**

Para analizar la expresión de moléculas de superficie en la membrana de linfocitos y MDSC generados *in vitro* se centrifugó la placa 1 minuto a 4000rpm, se desechó el sobrenadante y se agitó la placa para resuspender el pellet. Con el objetivo de evitar posteriores uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados (tabla 1), se añadieron 50 µl por pocillo de una solución de bloqueo de los receptores de la región Fc de los anticuerpos diluida 1/50 en PBS + FBS al 2% y, se incubó durante 20 minutos a 4°C. La placa se lavó con 150 µl de PBS y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y se agitó la placa para resuspender el pellet. Para el marcaje se añadieron los anticuerpos en 50 µl de PBS y se incubó 20 minutos a 4°C. En el caso de los anticuerpos intracelulares (Arg-1 y Granzima B) se añadió 100 µl de una solución de permeabilización diluido 1/3 y, a continuación, se añadieron 50 µl de Granzima B y Arg-1 y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Tras la incubación se volvió a añadir 150 µl de PBS y se centrifugó la placa 1 minuto a 4000 rpm. Para fijar las células se añadió 100 µl de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos a

temperatura ambiente. Finalmente se añadió 200 µl de PBS y se guardó en la nevera hasta su posterior análisis por citometría.

En la **tabla 1** se muestran los anticuerpos unidos a fluorocromos que se utilizaron para los distintos marcajes y sus correspondientes diluciones. Todos los anticuerpos utilizados son de la casa comercial Miltenyi Biotec.

1. LINFOCITOS (pulmón)	2. MDSC (tumor, pulmón y bazo)	3. MACRÓFAGOS (pulmón)
CD45-VIOBLUE (1/125)	CD45-VIOBLUE (1/125)	CD45-VIOBLUE (1/125)
CD3-PerCp (1/200)	Ly6G-PE (1/250)	F4/80 (1/250)
NKP46- FITC (1/ 250)	Ly6C-FITC (1/250)	CD11b-PerCP (1/250)
CD8-APC (1/250)	CD11b- PerCP (1/250)	Ly6C-FITC (1/250)
<i>GRAZIMA B - PE (1/200)</i>	<i>ARG-1- APC (1/200)</i>	<i>ARG-1 - APC (1/200)</i>

**Tabla 1.** Anticuerpos utilizados para el marcaje en suspensiones celulares de bazo, tumor y pulmones y de las distintas células del sistema inmunológico. Los anticuerpos intracelulares están marcados en cursiva y fueron añadidos al final del proceso.

#### 4.7 Análisis mediante citometría de flujo

Todas las muestras marcadas se analizaron con el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter) que se encuentra en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

En nuestros experimentos se utilizó la información de los fotodetectores FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL4 (PRCP), FL-6(APC), FL-9(VIOBLUE). Para llevar a cabo el análisis se añadió en los tubos de lectura 200 µl de las muestras marcadas junto con 300 µl de PBS. El análisis de los archivos resultantes del citómetro se realizó mediante el software Weasel v.2.6 y GraphPad 8.

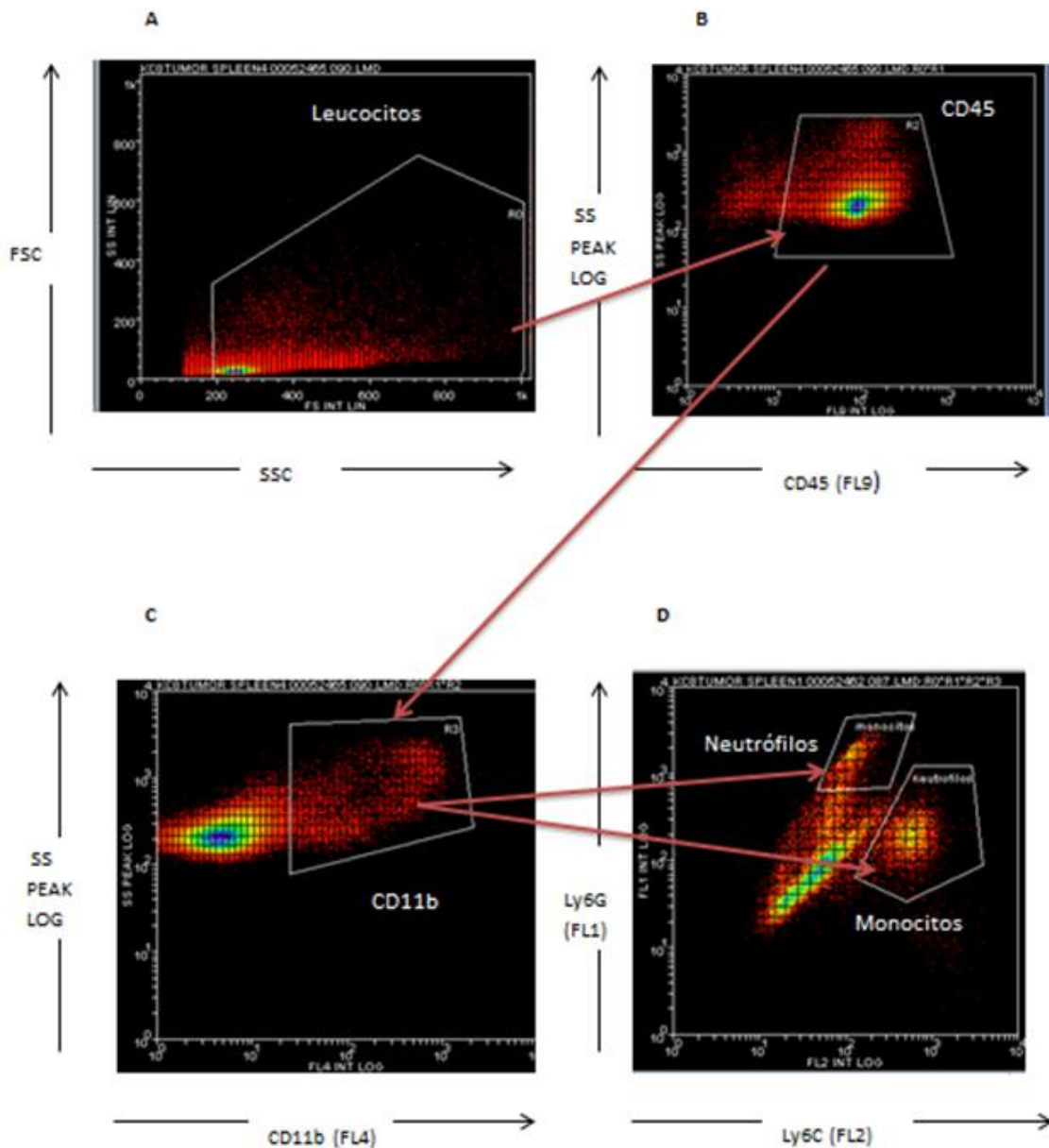
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificación y caracterización de MDSC en ratones inoculados con tumores

El estudio de las poblaciones de células inmunosupresoras se centra en la caracterización de las MDSC mediante el marcaje de distintos antígenos de superficie y cómo éstas varían en número en función de la presencia o ausencia de tumor.

Puesto que consideramos 2 subpoblaciones se llevó a cabo el marcaje con anticuerpos específicos anti-CD45, anti-CD11b, anti-Ly6G para PMN-MDSC (neutrófilos) y anti-CD45, anti-CD11b, anti-Ly6C para M-MDCS (monocitos) y su expresión se determinó monitorizando la fluorescencia de los fluorocromos correspondientes (tabla 1) mediante citometría (fig. 4). ,

En primer lugar, se seleccionó la población de leucocitos a estudiar en función del tamaño (FSC) y la complejidad celular (SSC) (fig. 4A). A partir de esa población se seleccionaron aquellos que eran CD45<sup>+</sup> (fig. 4B) puesto que es un antígeno común leucocitario y, de la misma forma, se escogió la población CD 11b<sup>+</sup> presente en la línea granulocítica (fig.4C) (18). Para finalizar, las poblaciones anteriores se separaron en Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) y Ly6C<sup>+</sup> (monocitos) (fig. 4D).

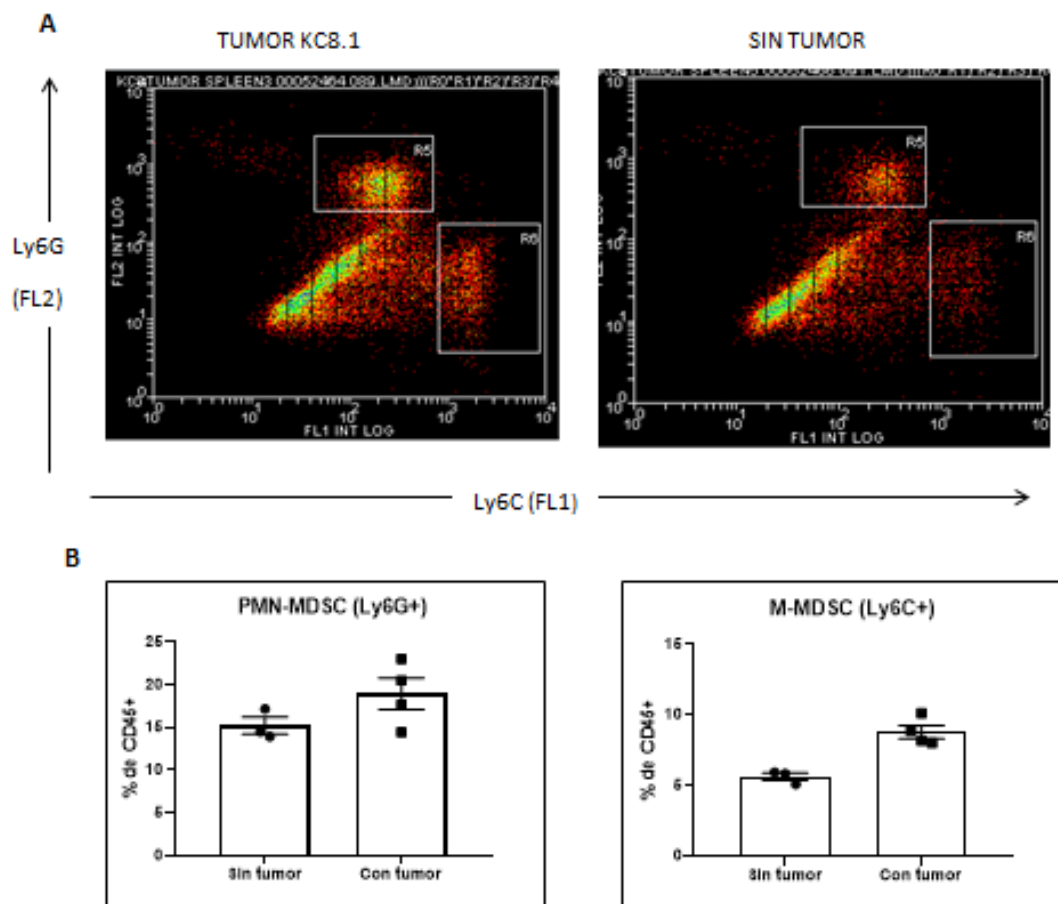


**Figura 4.** Representación mediante gráficos de puntos (dot-plot) de las poblaciones de MDSCs obtenidas mediante la técnica de citometría de flujo. A) Selección de linfocitos según tamaño y complejidad. B) Selección de las poblaciones CD45 positivas. C) Selección de las poblaciones CD11b positivas. D) Selección de las poblaciones Ly6G positiva (PMN-MDSCs) y Ly6C positiva (M-MDSCs) en bazo.

#### 5.1.1 Ensayo con tumor KC8.1

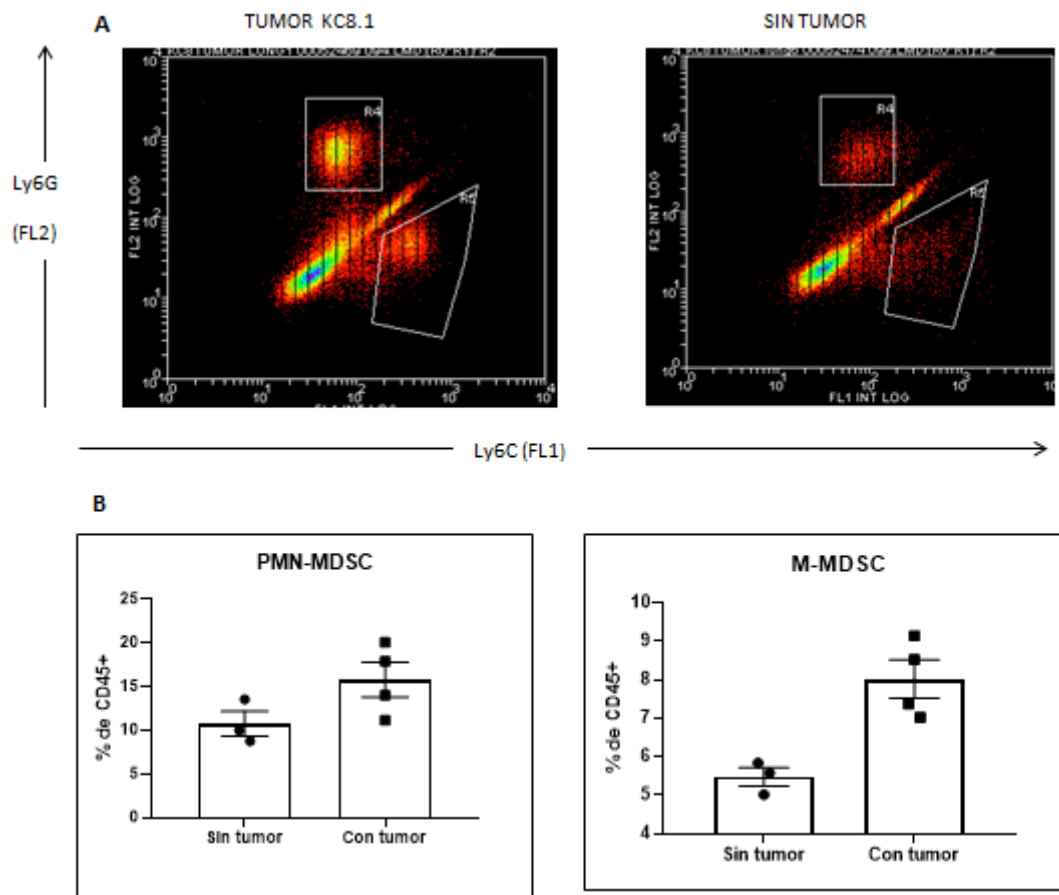
Este estudio se realizó con 3 de bazos y pulmones de ratones sanos y 4 bazos, tumores y pulmones de ratones con tumores KC8.1. Se investigó las posibles diferencias de poblaciones de M-MDSC y PMN-MDSC en los distintos órganos a través del marcaje y proceso nombrado en el apartado 5.1. En cada una de las muestras se

analizó el número de MDSC y se llevó a cabo el análisis comparativo en condiciones sanas y tumorigénicas (Fig.5). Se representó mediante dot-plots la densidad de población de PMN-MDSC (Ly6G) y M-MDSC (Ly6C) en bazo (fig.5A). Se analizó el porcentaje de MDSCs sobre el total de leucocitos (poblaciones CD45<sup>+</sup>) mediante “unpaired T Test” y se encontraron diferencias significativas entre las dos poblaciones en condiciones sanas (control) y condiciones tumorigénicas donde el aumento de MDSCs fue mayor en bazo con tumor KC8.1(fig.5B).



**Figura 5.** Caracterización mediante citometría de flujo de MDSC en bazo. Análisis comparativo entre presencia y ausencia de tumor. **A.** Representación mediante dot-plot de la densidad de población de neutrófilos (PMN-MDSC) y monocitos (M-MDSC) en muestras de bazo. **B.** Número total de neutrófilos (PMN-MDSC) y monocitos (M-MDSC) en 3 muestras de pulmones sanos y 4 pulmones tumorigénicos. En las gráficas, los datos de cada muestra son el resultado del valor medio de tres o cuatro datos experimentales  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

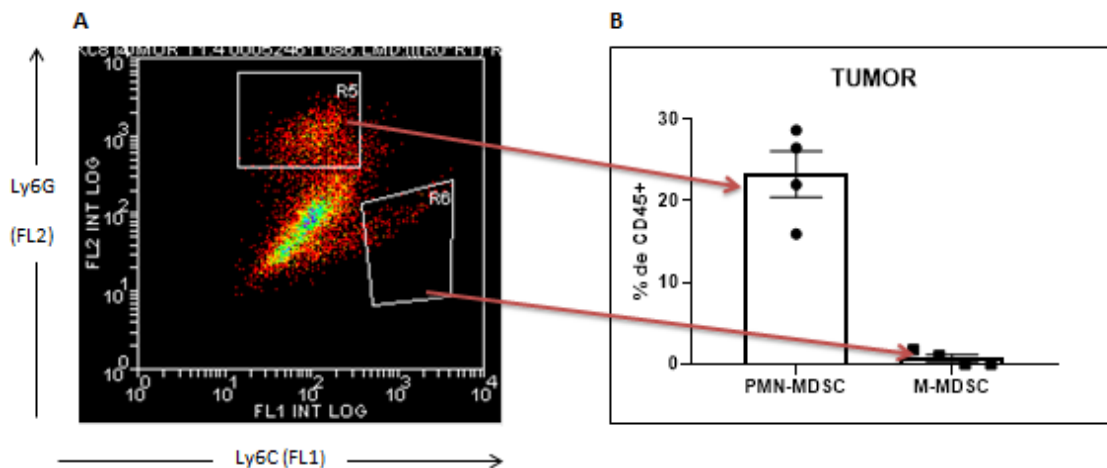
Después de analizar las poblaciones de MDSCs en bazo, se llevó a cabo en pulmones en las mismas condiciones (fig.6). En las representaciones dot-plot se observó una mayor densidad de las poblaciones PMN-MDSC y M-MDSC en pulmones de ratones con tumor KC8.1 (fig.6A) que, posteriormente, se confirmó estadísticamente mediante un “unpaired T Test”. El porcentaje de ambas poblaciones sobre el total de células CD45<sup>+</sup> fue mayor en pulmones de ratones con tumor, donde la media fue de 15% en PMN-MDSC y 8% para M-MDSC mientras que sin tumor estos valores fueron 10% y 5% respectivamente (fig.6B).



**Figura 6.** Caracterización mediante citometría de flujo de MDSC en pulmones. Análisis comparativo entre presencia y ausencia de tumor. **A.** Representación mediante dot-plot de la densidad de población de PMN-MDSC y M-MDSC en pulmones. **B.** Análisis estadístico de las poblaciones de MDSC sobre el porcentaje total de leucocitos en pulmones. Los datos de cada muestra son el resultado del valor medio de tres o cuatro datos experimentales  $\pm$  error estándar de la media (SEM).



A nivel de tumor se realizó un estudio comparativo del porcentaje de MDSC presentes sobre el total de leucocitos  $CD45^+$  (fig.7A). Observamos, como era de esperar, diferencias significativas entre el porcentaje de neutrófilos y de monocitos sobre el total de células  $CD45^+$  siendo el 22% y 1% respectivamente (fig.7B).



**Figura 7.** Caracterización mediante citometría de flujo de MDSC en tumor. **A.** Dot-plot donde seleccionó las poblaciones de MDSCs en tumor mediante el programa Weasel. **B.** Análisis comparativo del porcentaje de PMN-MDSC y M-MDSC sobre las células  $CD45^+$  en tumor.

Por tanto, tras el análisis con KC8.1, encontramos diferencias en el porcentaje de MDSCs en distintos órganos y en circunstancias control (sanas) y tumorigénicas, siendo significativamente mayor en aquellos que tenían tumor.

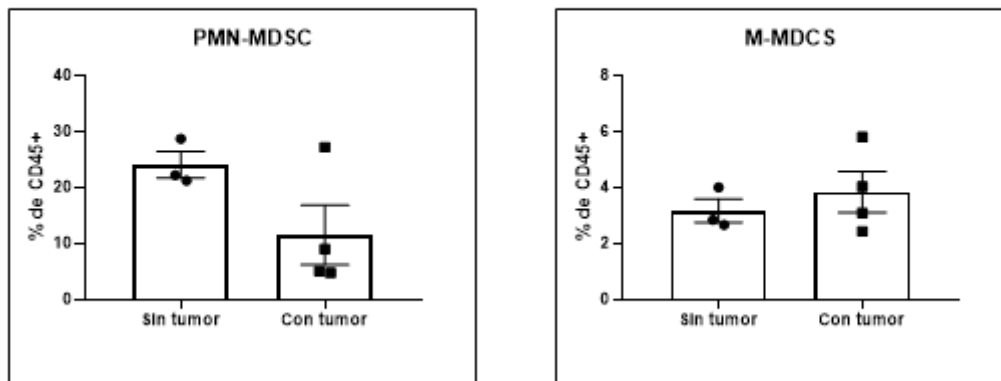
#### 5.1.2 Ensayo con tumor B16F10

Tras los resultados anteriores se llevó a cabo la caracterización de MDSC en otro tipo de tumor, en este caso de melanoma (B16F10). Para ello se realizaron los marcajes del apartado 5.1 y se analizaron de igual forma mediante citometría.

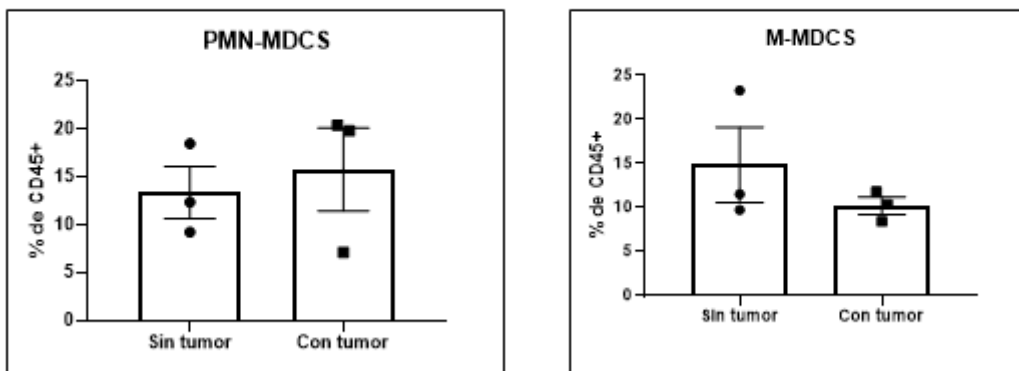
El estudio de MDSC sobre el total de células  $CD45^+$  en bazo dió resultados inesperados, donde se encontró un aumento de neutrófilos (PMN-MDSC) en condiciones sanas siendo alrededor del 25% frente al 12% en bazo con tumor. En el caso de las M-MDSC no se encontraron diferencias significativas ( $p$ -valor  $> 0.05$ ) entre bazo de ratón sano y con tumor (fig.8A). Este mismo análisis se realizó en pulmones

(fig.8B) tampoco se observaron diferencias significativas en neutrófilos (PMN-MDSC) en las diferentes condiciones siendo del 12% y 15% sobre el total de células CD45<sup>+</sup>. En referencia a los monocitos (M-MDCS) encontramos un pequeño aumento en condiciones sin tumor. Tras estos resultados, se decidió utilizar el modelo tumorigénico de KC8.1 para realizar los ensayos de proliferación y supresión.

### A. BAZO

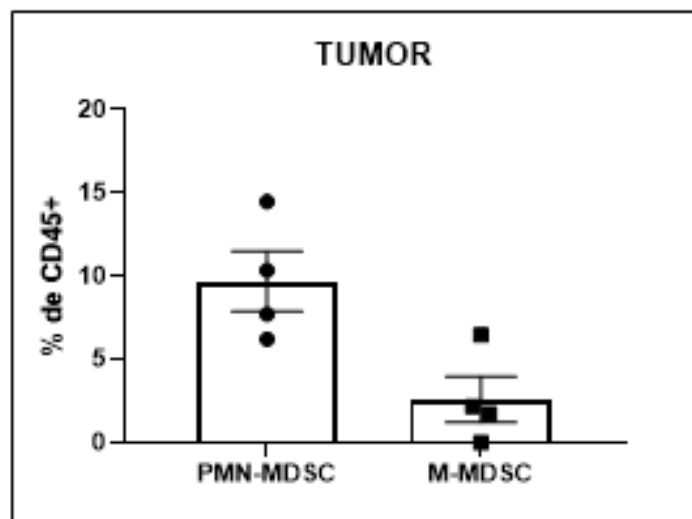


### B. PULMÓN



**Figura 8.** Caracterización mediante citometría de flujo de MDSC en bazo y pulmón en condiciones sanas y con tumor B16F10. **A.** Análisis estadístico del porcentaje de PMN-MDSC y M-MDSC sobre el total de CD45<sup>+</sup> en bazos. **B.** Análisis estadístico del porcentaje de PMN-MDSC y M-MDSC sobre el total de CD45<sup>+</sup> en pulmones. Las gráficas representan las medias

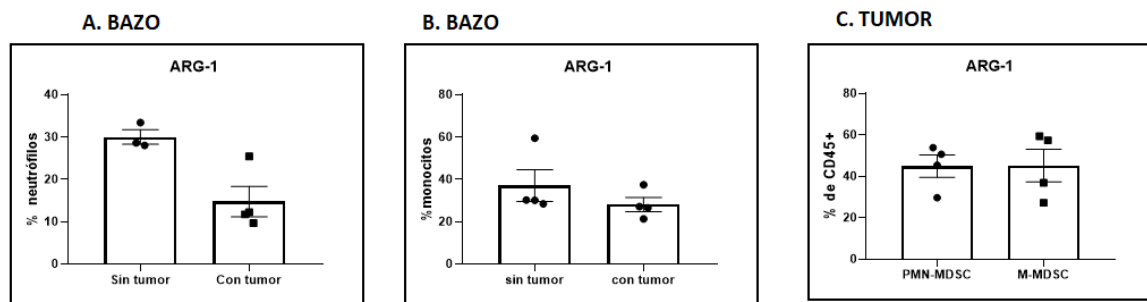
A nivel de tumor se realizó un estudio comparativo del porcentaje de MDSC presentes sobre el total de leucocitos  $CD45^+$  (fig.9). Observamos diferencias significativas entre el porcentaje de neutrófilos y de monocitos sobre el total de células  $CD45^+$  siendo el 10% y 2% respectivamente.



**Figura 9.** Caracterización del porcentaje de células PMN-MDSC y M-MDSC sobre el total de células  $CD45^+$  en tumor B16F10. La gráfica representa la media  $\pm$  el error estándar de la media.

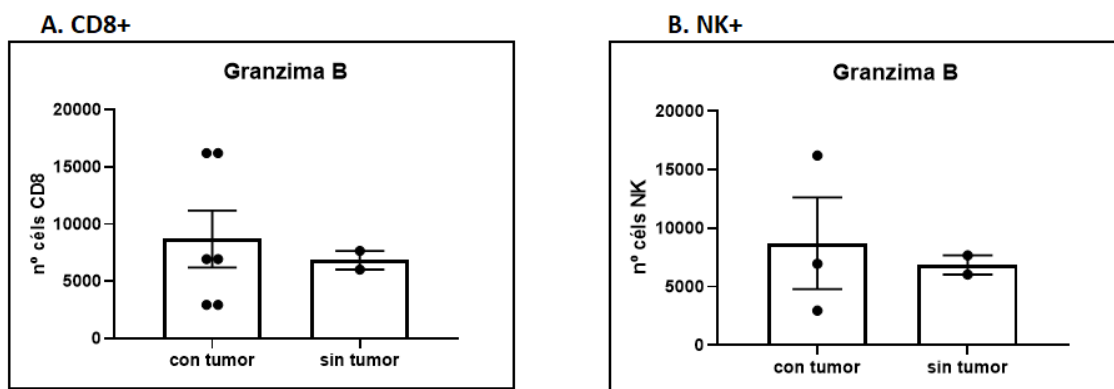
La capacidad inmunomoduladora de las MDSCs está asociada a diferentes vías de señalización inmunosupresoras, entre ellas a la expresión de la enzima Arginasa (Arg-I) (4).

Sobre estas muestras se realizó un marcaje con anti-Arg-1 y así poder ver que niveles de expresión de esta molécula tenían estas MDSC en las distintas muestras. En la figura 10A y 10B se representó el nivel de PMN-MDSC y M-MDSC, respectivamente, que expresaron arginasa-1 en condiciones con tumor y sin tumor, donde estaba aumentada en condiciones sanas (control). En el caso del tumor (fig.10 C) se encontró que el porcentaje de células que expresaban Arginasa-1 era parecido entre ambas poblaciones.



**Figura 10.** Caracterización del porcentaje de células PMN-MDSC y M-MDSC que expresan Arginasa-1 en condiciones sanas y con tumor. Las gráficas representan valores de media  $\pm$  el error estándar de la media. **A.** Expresión de esta molécula en poblaciones de PMN-MDSC en bazo. **B.** Expresión de Arg-1 por M-MDSC bazo. **C.** Niveles de expresión de Arg-1 en las distintas poblaciones de MDSCs en muestras de tumor B16f10.

Otra característica que se analizó fue el porcentaje de células  $CD8^+$  y Natural Killer (NK) que expresaban Granzima B en pulmones. El marcaje se realizó sobre estas células en condiciones sanas (control) y con tumor. Los resultados señalaron que no había un aumento significativo de expresión de Granzima B en células  $CD8^+$  (fig.11A) ni en NK (fig.11B) en pulmones entre ambas situaciones.



**Figura 11.** Caracterización del número de células  $CD8^+$  y NK en pulmones que expresan Granzima B en condiciones sanas y con tumor. En las gráficas se representa el valor de la media  $\pm$  el error estándar de la media. **A.** Número de células  $CD8^+$  que expresan Granzima B en pulmón. **B.** Número de células NK que expresan Granzima B en pulmón.

## **5.2 Puesta a punto de ensayos de proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>**

Los mecanismos de activación y regulación de linfocitos T involucran a varias proteínas que son capaces de activar un gran número de moléculas. La señal generada por el TCR por sí sola no es suficiente para la activación del linfocito T. La unión del TCR y el péptido asociado a MHC genera la primera señal citoplasmática para la activación linfocitaria a través del correceptor CD3. [20]

La molécula CD28 es uno de los coestimuladores más importantes en células T, esencial para la completa activación de estas células. Su papel es generar la segunda señal de activación para los linfocitos T a través de su interacción con las moléculas CD80/CD86 presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno. [21]

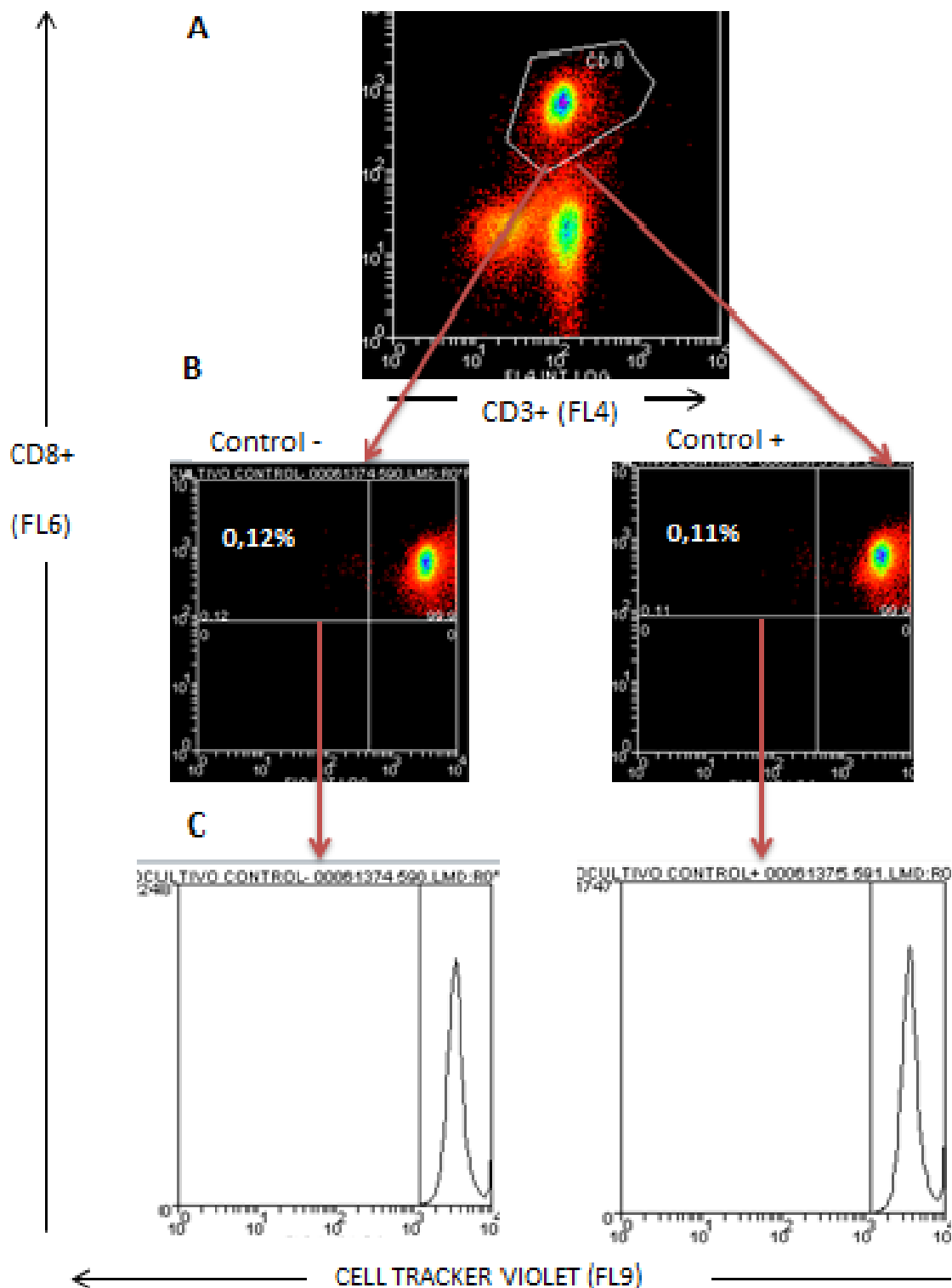
En este apartado se reflejan los resultados derivados de los distintos ensayos de proliferación linfocitaria. Para ello se estimuló el TCR de esplenocitos de ratones C57BL/6 con anticuerpos anti-CD3/CD28 y ovoalbúmina (OVA) para esplenocitos de ratones OT II ya que éstos expresan únicamente TCR que reconocen el péptido específico 323-339 de la ovoalbúmina. Las células se analizaron por citometría de flujo seleccionando las poblaciones de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y se realizaron histogramas representando su proliferación.

Puesto que el presente trabajo ha supuesto la puesta a punto en el laboratorio de este ensayo, con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para su realización y, necesario para evaluar la capacidad supresora de las MDSC, se probaron las siguientes condiciones experimentales:

### **5.2.1 Marcador de proliferación CellTracker™ Violet BMQC Dye**

En un primer intento se llevó a cabo el marcaje, en una placa de 96 de fondo curvo, de una suspensión de ganglios de ratones sanos con 1µl de CellTracker™ Violet y, posteriormente, se sembraron 5·10<sup>5</sup> células a cada pocillo. A continuación las poblaciones de linfocitos T se estimularon mediante el uso de anti-CD3 y anti-CD28 a excepción del control negativo. Tras 24 horas, se evaluó, mediante el análisis por citometría de flujo, los niveles de fluorescencia de Cell Tracker Violet en esta

población donde en cada división celular el nivel de fluorescencia disminuye a la mitad. Los resultados obtenidos muestran que los linfocitos CD8<sup>+</sup> sin estimulación (control negativo) no mostraron signos de proliferación. De igual forma, aquellos que fueron estimulados (control +) aunque el marcador de proliferación si penetró en las células ya que es positivo en FL9 tampoco se observó proliferación (fig.12). Las células CD4<sup>+</sup> fueron analizadas de igual forma dando los mismos resultados.



**Figura 12.** Análisis de la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo. **A.** Diagrama dot-plot de la población celular presente en la muestra en función de su tamaño, dado por el parámetro FSC y la complejidad celular, dada por el parámetro SSC. La región delimitada representa la población de CD8<sup>+</sup> sobre la que se realiza el análisis. **B.** Diagramas dot-plot que representan la fluorescencia de Violet (FL9) debida a la expresión de Cell Tracker frente al parámetro CD8 (FL6) de los controles positivos y negativos. Los números indican los porcentajes de células que han proliferado (0.12 y 0.11). **C.** Proliferación expresada mediante histogramas del control + (estimulado con CD3/CD28) y del control - (sin estimulación).

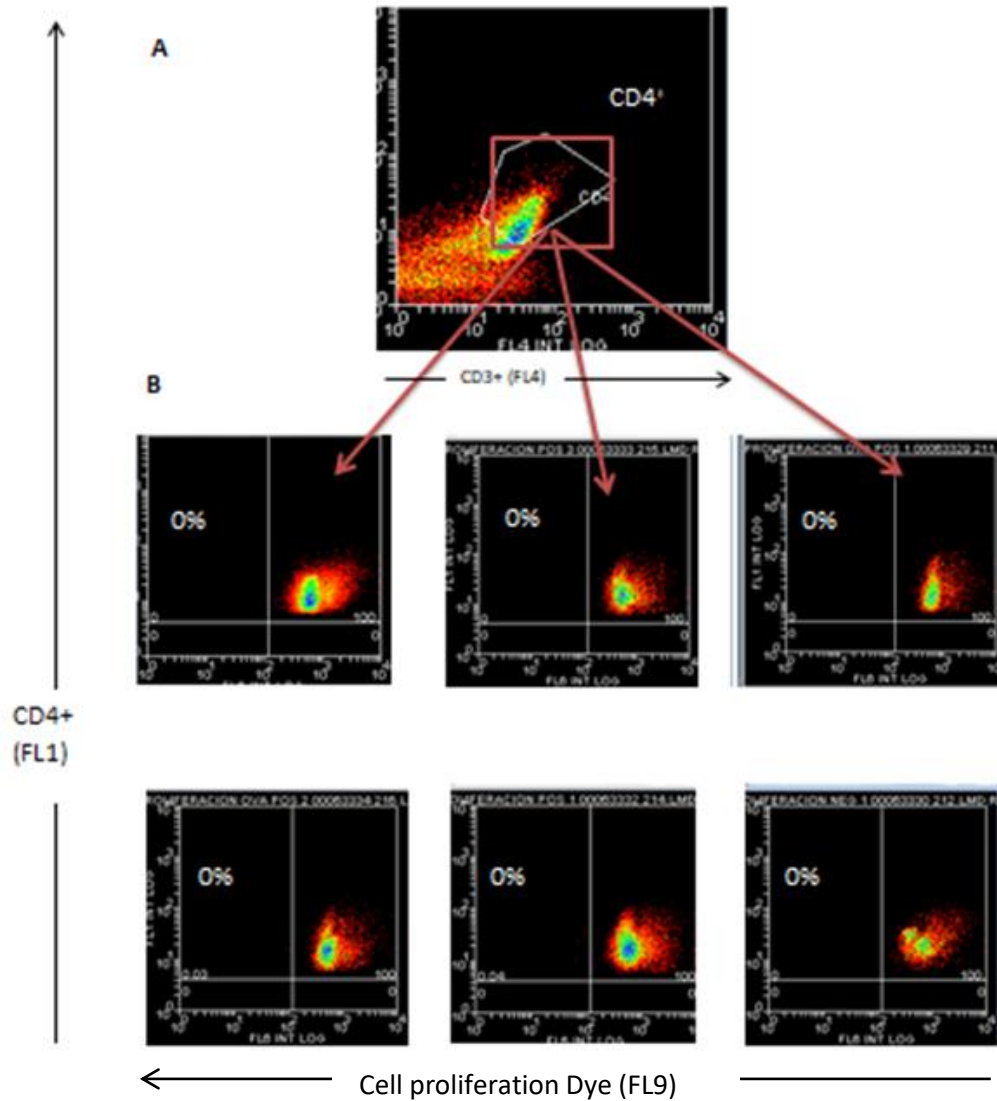
### 5.2.2 Marcador de proliferación eBioscience Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 (CPD)

#### *Ensayo 1*

Tras los resultados obtenidos con CellTracker™ Violet se modificó el marcador de proliferación y algunas condiciones del experimento. En primer lugar, los linfocitos se obtuvieron a partir de suspensiones celulares de 1 bazo de ratón C57BL/6 y 1 bazo de ratón OT II. Los esplenocitos se incubaron en placa de 96 pocillos de fondo curvo y se estimularon con anticuerpos anti-CD3/CD28 y OVA respectivamente. Las muestras se marcaron con anti-CD4 y anti-CD8 y se usó el marcador CPD de fluorescencia roja (FL6) para seleccionar las poblaciones de células proliferantes.

Se analizaron los linfocitos CD4<sup>+</sup> de las muestras estimuladas con OVA y con CD3/CD28. A pesar del cambio de marcador y la fuente de obtención de linfocitos no se observó proliferación en ninguna de las muestras (0%) (fig.13). Las células CD8<sup>+</sup> obtuvieron los mismos resultados.





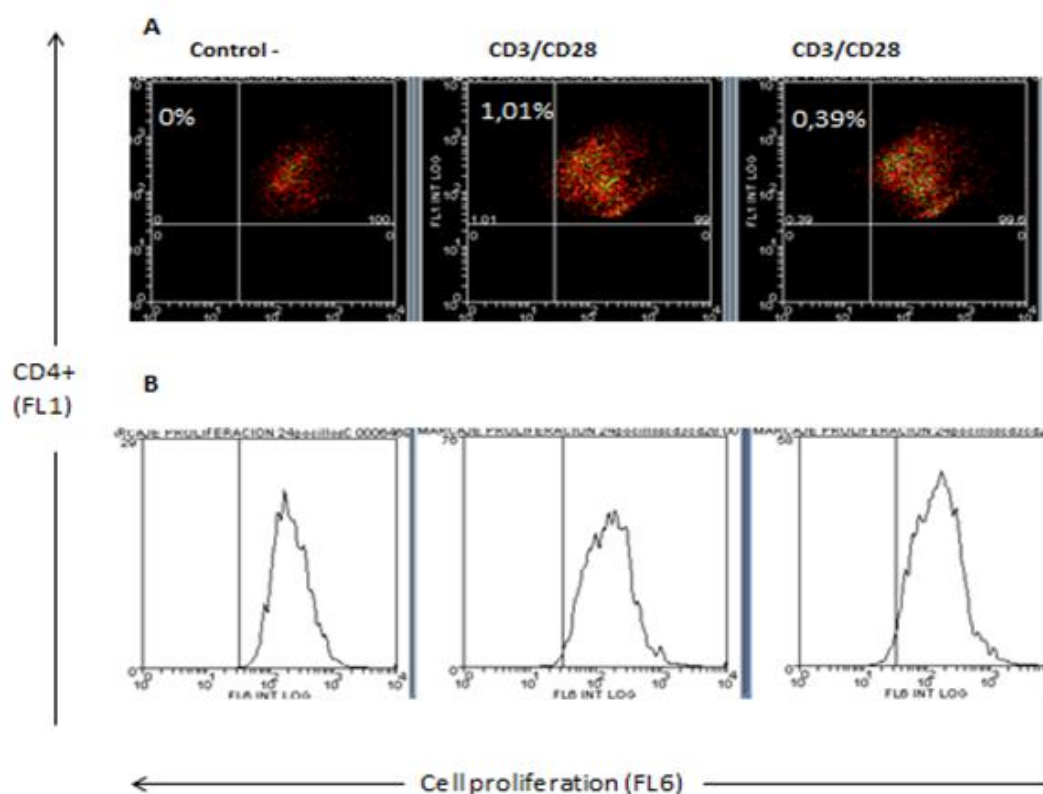
**Figura 13.** Análisis de la proliferación mediante citometría de flujo. **A** Diagrama dot-plot de la población de CD4<sup>+</sup> sobre la que se realiza el análisis **B**. Diagramas dot-plot que representan la fluorescencia de CPD (FL6) frente al parámetro CD4<sup>+</sup> (FL1) de las células estimulados con OVA. Los números indican los porcentajes de células que han proliferado.

## Ensayo 2

Tras un segundo intento fallido, se decidió repetir el ensayo con el mismo marcador de proliferación y realizar modificaciones experimentales. En este caso se emplearon linfocitos de bazo y ganglio y se sembraron en distintos tipos de placas: Placa ELISA, placa de 96 de fondo curvo, placa de 96 de fondo plano y placa de 24 pocillos. En cada una se sembraron 10<sup>6</sup> células y, seguidamente, se realizaron marcajes con anti-CD3,

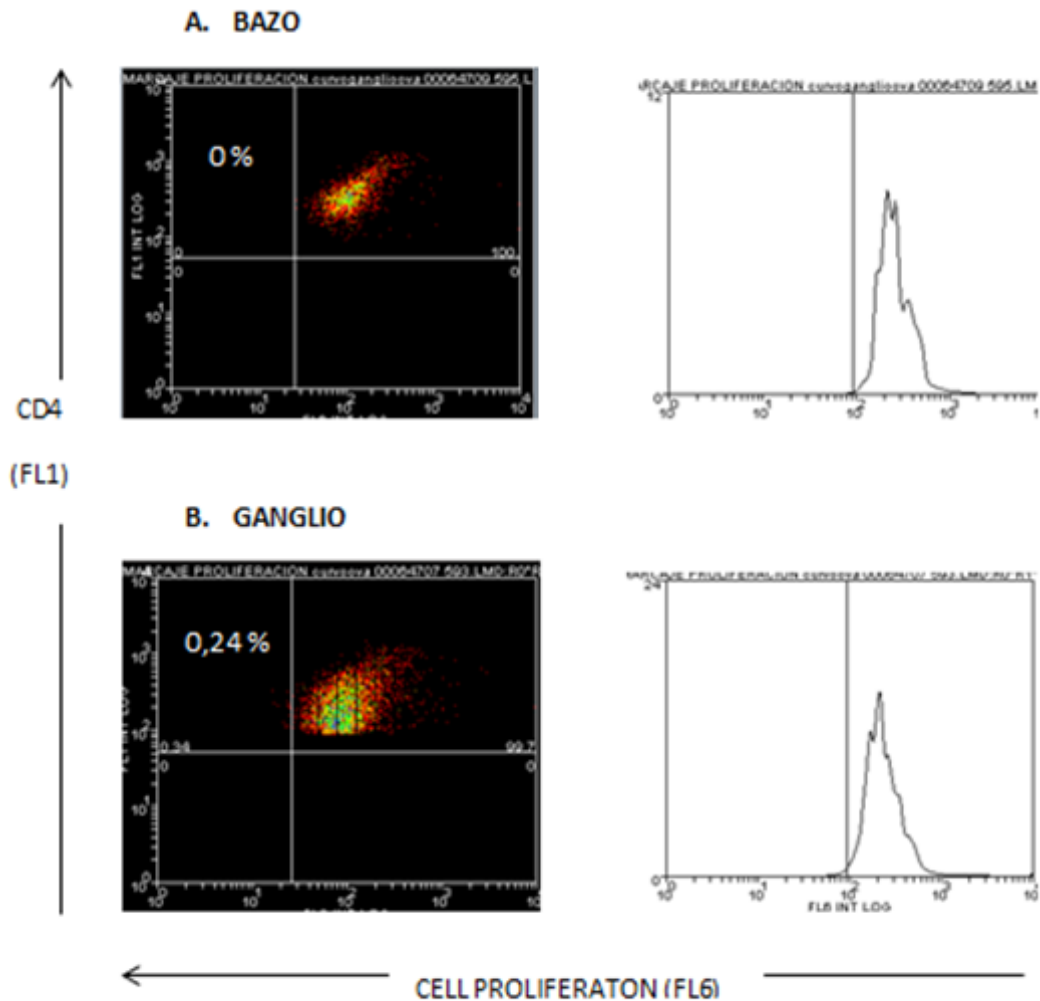
anti-CD4, anti-CD8 y el marcador de proliferación. Las células se fijaron con PFA al 2% y tras 24h se analizaron mediante citometría.

En el caso de la placa de 24 pocillos se llevó a cabo el marcaje de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de ganglios y bazo sin estimular (control -) y con estimulación. Los resultados analizados con Weasel mostraron que la proliferación no resultó exitosa, con valores de 0%, 1% y 0,4% (fig.14A). Los histogramas tampoco reflejan ningún tipo de proliferación ni generación celular (fig.14B).



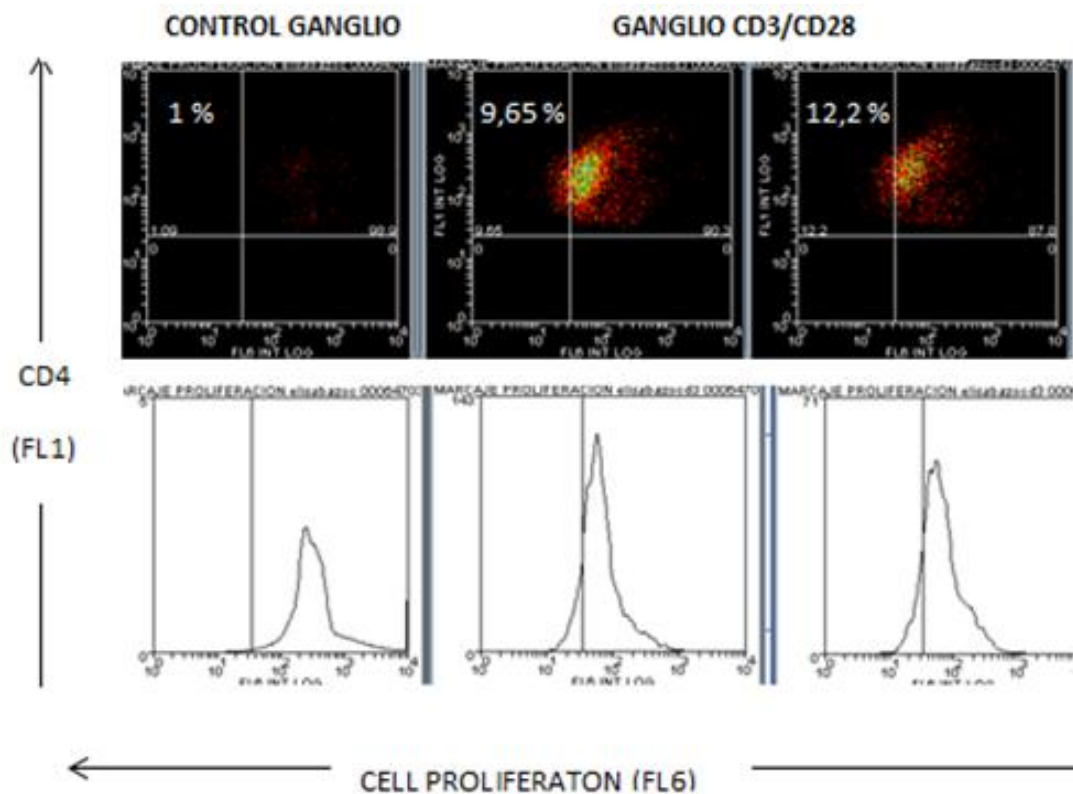
**Figura 14.** Análisis de la proliferación en placa de 24 pocillos mediante citometría de flujo. **A** Diagrama dot-plot de la población de CD4<sup>+</sup>. Representación del porcentaje de células que han proliferado en el caso del control- sin estimulación y de las dos réplicas de muestras estimuladas. **B** Representación en histogramas de los resultados de proliferación.

En la placa de 96 pocillos con fondo curvo se llevó a cabo el mismo marcaje con muestras de ganglio y bazo de ratones OT II por lo que la estimulación de esplenocitos se llevó a cabo con OVA. Los resultados muestran (fig.15) que en este caso tampoco funcionó ya que los valores de proliferación son 0% en bazo y 0,24% en ganglio.



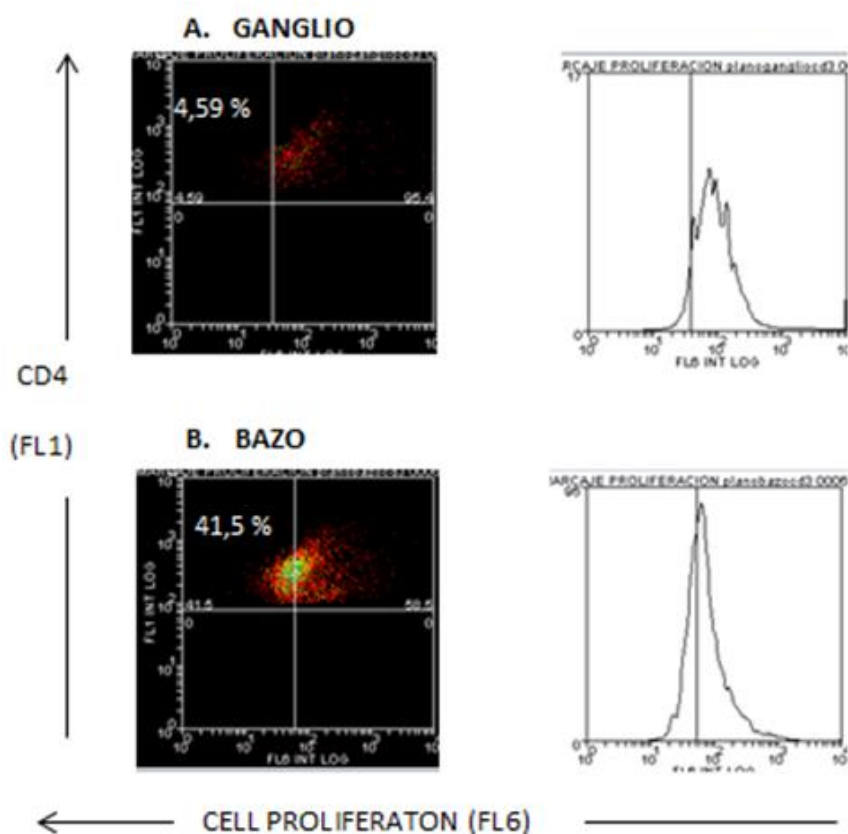
**Figura 15.** Análisis de la proliferación en placa de fondo curvo mediante citometría de flujo. **A.** Diagrama dot-plot e histograma que representan la proliferación de las células  $CD4^+$  de bazo. **B.** Diagrama dot-plot e histograma de la proliferación de células  $CD4^+$  de ganglio.

Partiendo de las condiciones establecidas en el caso anterior se realizó el análisis de proliferación en una la placa ELISA. Se analizó de igual forma mediante citometría y posteriormente con Weasel. Los resultados de la figura 16 muestran, a pesar de no alcanzar los valores deseados, una leve proliferación de los linfocitos  $CD4^+$  de los ganglios. Observamos una pequeña tendencia hacia la izquierda donde se indica el porcentaje de células que han proliferado (9% y 12%).



**Figura 16.** Análisis de la proliferación en placa ELISA mediante citometría de flujo. **A** Diagramas dot-plot de la población de CD4<sup>+</sup> de ganglios donde se representan los valores de proliferación. Representación en histogramas de los resultados de proliferación.

Para terminar este ensayo, se hizo un último análisis de proliferación de linfocitos en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Como en el resto, se llevó a cabo el marcaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y previamente se tiñó con el marcador de proliferación. En esta ocasión se observó un desplazamiento hacia la izquierda. En el caso de los linfocitos CD4<sup>+</sup> de ganglios hay una proliferación del 4,5% (fig.17A) mientras que en el bazo este número llega al 41,5% (fig.17B). Los datos fueron representados en dot-plot y posteriormente en histogramas.

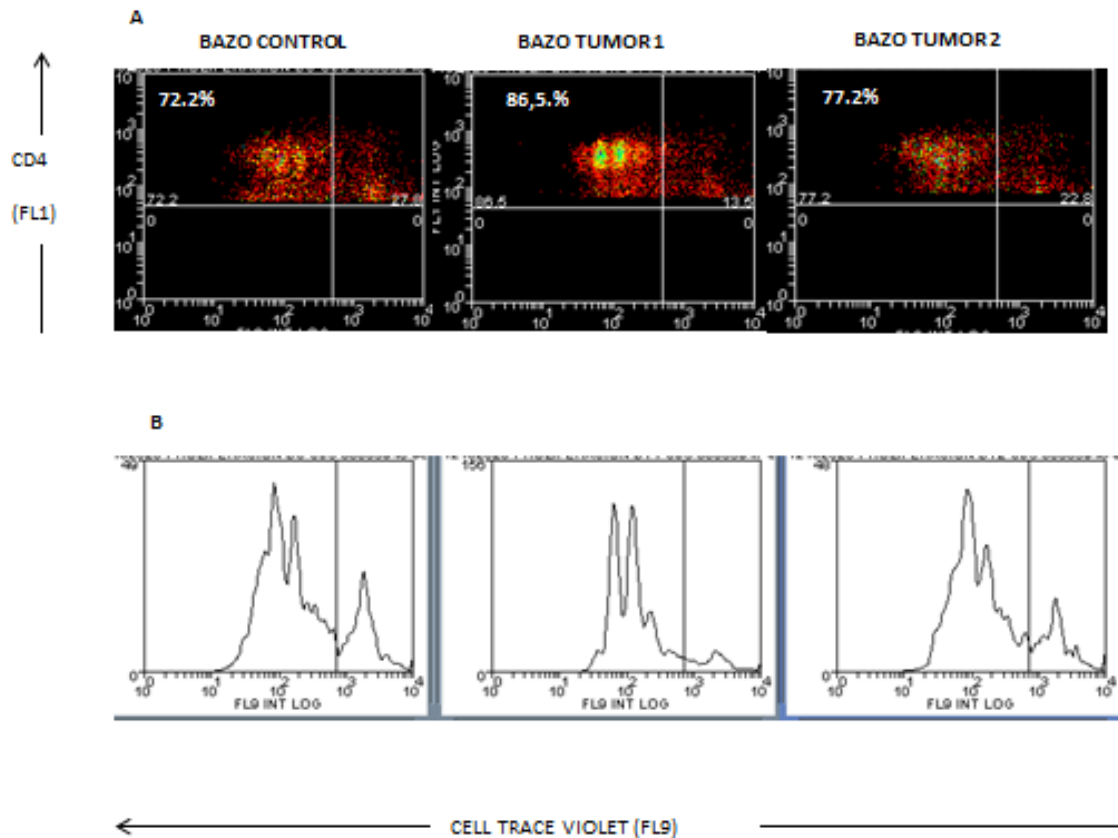


**Figura 17.** Análisis de la proliferación en placa de 96 de fondo plano mediante citometría de flujo. **A** Dot-plot e histograma de la población de CD4<sup>+</sup> de ganglios donde se representan los valores de proliferación. **B**. Dot-plot e histograma de la proliferación analizada en bazo.

### 5.2.3 Marcador de proliferación CellTrace™ Violet

Con los resultados obtenidos en el ensayo 2, se decidió realizar un último cambio para ver si podíamos mejorar los porcentajes de proliferación. Para ello se utilizó el marcador CellTrace™ Violet (CTV). Este Kit se utiliza para el marcaje de células *in vivo* e *in vitro* y poder rastrear múltiples generaciones utilizando una dilución de colorantes a través de citometría de flujo. Los esplenocitos se obtuvieron a partir de un ratón sano (bazo control), y dos ratones con tumor KC8.1 (bazo tumor 1, bazo tumor 2). En una placa ELISA se sembraron 10<sup>6</sup> células de cada muestra y se marcaron con 2μl de Cell Trace Violet en 2ml de PBS. Los esplenocitos se estimularon con CD3<sup>+</sup> pegado a placa y CD8<sup>+</sup> en suspensión y se analizaron mediante citometría. Los resultados obtenidos mostraron una proliferación mayor del 75% en todos los casos (fig.18). En los gráficos dot-plot se observó el desplazamiento de las células hacia la izquierda. El bazo

control (ratón sano) presentó una proliferación del 72%, el bazo de tumor 1 el 86% y el bazo de tumor 2 el 77% (fig.18A). Además en los histogramas se observaron 3-4 generaciones distintas de células proliferantes (fig.18B). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> también fueron analizados y su proliferación obtuvo porcentajes similares.



**Figura 18.** Análisis de la proliferación mediante citometría de flujo. **A** Diagramas dot-plot de la población de CD4<sup>+</sup> de bazo control, bazo con tumor 1 y bazo con tumor 2 que muestran los porcentajes de proliferación celular. **B** Representación en histogramas de la proliferación en las muestras de bazo control, bazo tumor 1 y bazo tumor 2 donde se muestran las distintas generaciones celulares.

Tras los resultados obtenidos en este último ensayo se logró poner a punto la proliferación celular con el marcador CTV. Este es, por tanto, el que se utilizará para valorar la supresión de MDSC en los siguientes experimentos.

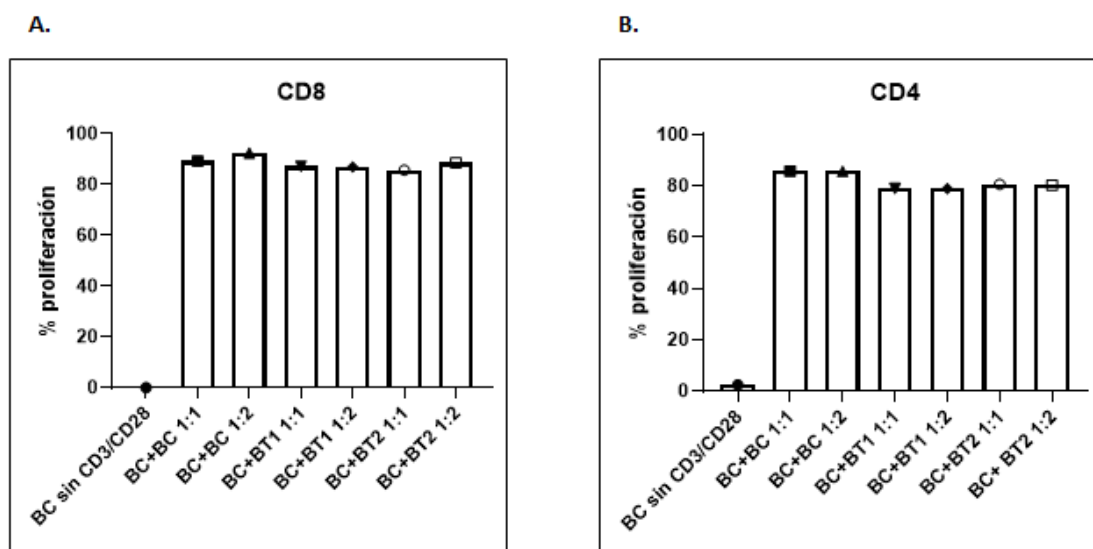
### 5.3 Estudio de la capacidad inmunosupresora de MDSCs y del efecto de BCG sobre ellas.

Uno de los objetivos principales de este trabajo consistía en valorar la capacidad de las MDSCs de suprimir a los linfocitos T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ). Para ello, fue necesario poner a punto ensayos de proliferación linfocitaria (5.1) ya que era la base de este experimento. Para medir esta supresión se han utilizado suspensiones de bazos de ratones sanos marcados con Cell Trace Violet (CTV) como controles, suspensiones de bazos de ratones con tumor, y suspensiones de bazos de ratones con tumor vacunados con BCG. Se realizaron cocultivos de los bazos control junto con los bazos de ratones con tumor vacunados y sin vacunar y se determinó la supresión mediante ensayos de proliferación. Además se estudió si la administración de BCG en ratones con tumor podría impulsar cambios mielopoyéticos disminuyendo la frecuencia de progenitores con capacidad inmunosupresora.

#### *Ensayo 1*

En este ensayo se utilizaron suspensiones bazos que provenían de ratón sano (bazo control) y de 2 ratones con tumor KC8.1 (bazo tumor 1 y bazo tumor 2). Para analizar la capacidad inmunosupresora se cultivaron en un ratio 1:1 y 1:2 el bazo control marcado frente al bazo control (BC), bazo tumor1 (BT1) y bazo tumor 2(BT2). Las poblaciones de esplenocitos se marcaron con anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 y, bajo estas condiciones, se analizó la proliferación de éstas mediante citometría de flujo.

Se determinaron los porcentajes de proliferación para representar la posible inmunosupresión. Se utilizó como referencia un control negativo que no tenía estimulación y por tanto no proliferó (BC sin CD3/CD28). En el análisis de células  $CD8^+$  (fig. 19A) el porcentaje de proliferación en bazos sin tumor (Bc+bc) fue alrededor del 90% en ambos ratios mientras que en el caso de bazos con tumor (Bc+Bt1/Bt2) este dato fue del 80% sin observar diferencias entre los distintos ratios. El caso de las células  $CD4^+$  fue bastante similar, donde los porcentajes de proliferación variaban un 10% entre bazos con tumor y bazos sin tumor (fig.19B). Por tanto, con estos datos no podemos concluir que en los bazos con tumor haya una mayor supresión de esplenocitos, mediado por MDSCs.



**Figura 19.** Análisis de la inmunosupresión de esplenocitos en bazo sano y con tumor. Los gráficos muestran el dato individual de cada punto experimental. **A.** Representación gráfica del porcentaje de células  $CD8^+$  que han proliferado al cocultivarse con bazo sano (BC) y con tumor (BT1 y BT2) en ratios 1:1 y 1:2 respectivamente. **B.** Representación gráfica del porcentaje de células  $CD4^+$  que han proliferado al cocultivarse con bazo sano (BC) y con tumor (BT1 y BT2) en ratios 1:1 y 1:2 respectivamente.

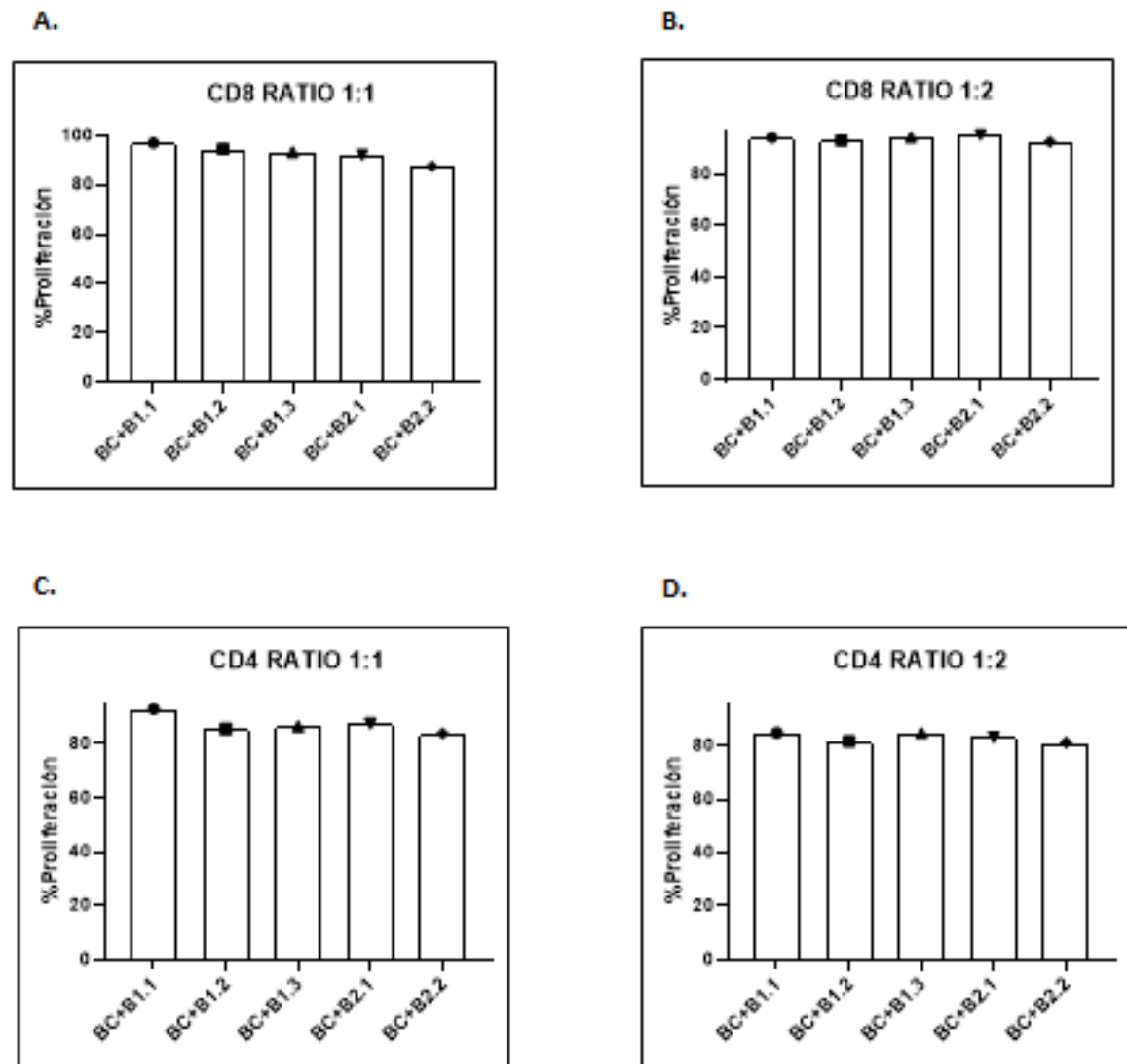
## Ensayo 2

En esta ocasión la supresión se midió a partir de suspensiones de bazo control (sano) marcados con CTV que se cultivaron junto con bazo con tumor y con tumor vacunados con BCG. Se utilizaron ratios 1:1 y 1:2 y se estimularon con CD3/CD28. El marcaje de linfocitos T y el análisis fue el mismo que en el ensayo anterior (ensayo 1).

El análisis de supresión se llevó a cabo con BC marcado + B1 (ratones con tumor KC8.1 vacunados con BCG) o B2 (ratones con tumor KC8.1 sin vacunar) en ratios 1:1 y 1:2 respectivamente. En los resultados mostrados en la figura 20 se observó que la proliferación de los esplenocitos  $CD8^+$  en bazo vacunados (B1.1, B1.2 Y B1.3) fue de un 90% aproximadamente, no viéndose diferencias con el mismo análisis en el ratio 1:2(fig.20AyB). En los esplenocitos  $CD4^+$  la proliferación también fue muy alta (80%) en ambos ratios (fig.20CyD). En el caso de los cocultivos de bazo control con bazo con tumor vacunados (B2.1, B2.2) la proliferación de ambas poblaciones de esplenocitos fue muy parecida, mostrando valores entorno al 85-90%. Por tanto, si la proliferación de esplenocitos fue muy elevada en bazo con tumor sin vacunar era de esperar que



los vacunados tuvieron un rango también elevado. Con estos resultados, no encontramos diferencias de proliferación y por tanto de supresión en los esplenocitos cocultivados con bazo vacunado y sin vacunar.



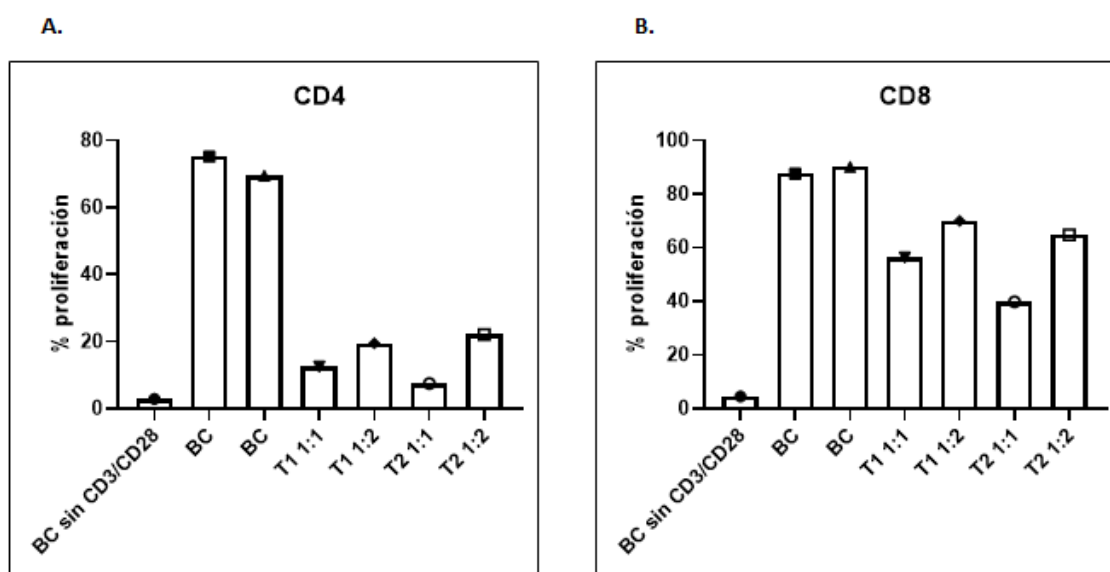
**Figura 20.** Análisis de la proliferación en esplenocitos en Cocultivo con bazo con tumor vacunados con BCG y sin vacunar. Los gráficos muestran el dato individual de cada punto experimental **A.** Porcentajes de proliferación de CD8 en ratios 1:1 de los bazo con tumor vacunados (B1) y sin vacunar (B2). **B.** Porcentajes de proliferación de CD8 en ratios 1:2 de los bazo con tumor vacunados (B1) y sin vacunar (B2) **C** Porcentajes de proliferación de CD4 en ratios 1:1 de los bazo con tumor vacunados (B1) y sin vacunar (B2) **D.** Porcentajes de proliferación de CD4 en ratios 1:1 de los bazo con tumor vacunados (B1) y sin vacunar (B2).

### Ensayo 3

Ante los resultados anteriores, donde no se observó supresión a nivel de bazo, se decidió realizar cocultivos de esplenocitos con MDSCs de tumores en placa de 96 pocillos. El aislamiento de las MDSC se llevó a cabo a partir de suspensiones de tumores de ratones vacunados con BCG (T1) y sin vacunar (T2). Para ello se empleó la técnica de separación magnética donde se marcaron las células de la suspensión con anticuerpos anti-Ly6G (PMN-MDSC). Tras la incubación se añadieron perlas magnéticas anti-PE que se unirían a los anticuerpos anti Ly6G-PE. A continuación, en una placa de 96 pocillos, se cultivaron  $10^5$  células del bazo control marcadas y estimuladas con CD3/CD28 y en cada uno se añadieron los PMN-MDSC separados de los tumores vacunados y sin vacunar. Para valorar la supresión, se marcaron los esplenocitos y se analizaron igual que los ensayos 1 y 2.

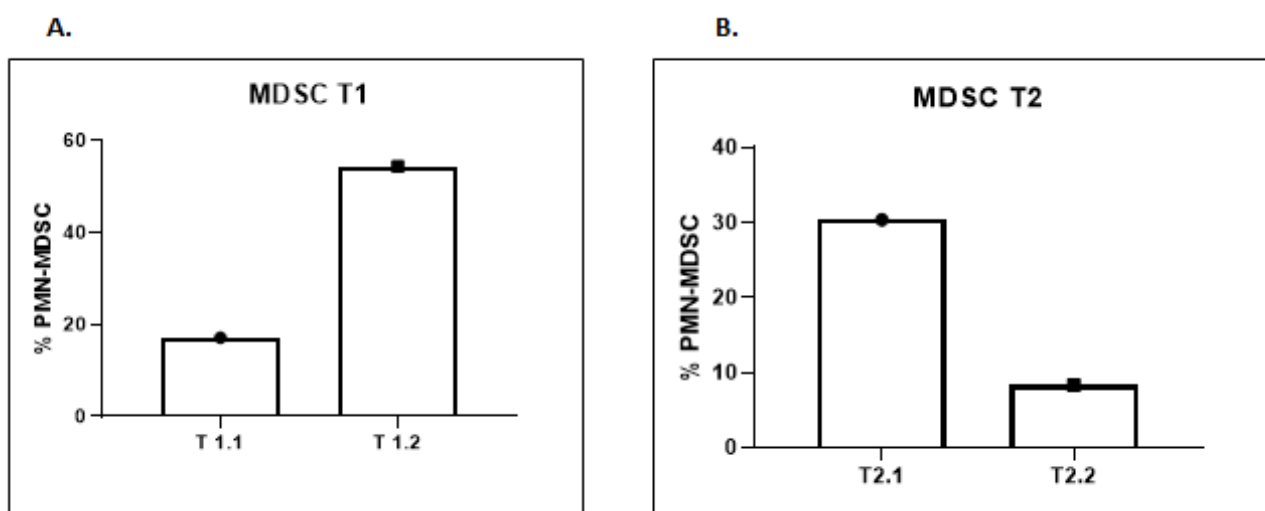
En este ensayo se midió la supresión de esplenocitos de bazo control (sano) en cocultivo con tumor vacunado (T1) o tumor sin vacunar (T2) en ratios de 1:1 y 1:2. Se utilizaron controles negativos (BC sin CD3/CD8) y positivos (BC) como referencia. En el caso de los cocultivos con tumores el porcentaje de proliferación de  $CD4^+$  cayó hasta un 15%. Para los esplenocitos  $CD8^+$  (fig. 21B) aunque en menor medida que las células  $CD4^+$ , la proliferación dio valores entre el 40-60% (fig.21A). Estos datos muestran una proliferación mucho menor en comparación con los resultados anteriores con bazos (ensayos 1 y 2), por tanto existe una mayor supresión de las MDSCs a nivel de tumor.

Por otro lado, la proliferación de  $CD4^+$  y  $CD8^+$  en ratones vacunados (T1) y sin vacunar (T2) no presentó diferencias entre sí. En ambas situaciones existe una supresión debido a la disminución de células proliferadas pero las réplicas de ambos son bastante dispares entre sí. Por tanto estos datos no mostraron diferencias en la supresión entre ratones vacunados y sin vacunar.



**Figura 21.** Análisis del porcentaje de proliferación en diferentes poblaciones de linfocitos T. Los gráficos muestran el dato individual de cada punto experimental **A.** Representación gráfica del porcentaje de proliferación de células  $CD4^+$  en ausencia de estímulo (BC sin CD3/CD28), en presencia de estímulo (BC) y, en cocultivo con tumores de ratones vacunados (T1) y sin vacunar (T2) en ratios 1:1 y 1:2. **B.** Representación gráfica del porcentaje de proliferación de células  $CD8^+$  en ausencia de estímulo (BC sin CD3/CD28), en presencia de estímulo (BC) y, en cocultivo con tumores de ratones vacunados (T1) y sin vacunar (T2) en ratios 1:1 y 1:2.

Tras estos resultados y en consonancia con nuestra hipótesis se realizó un análisis para ver si el número de PMN-MDSCs era menor en ratones con tumor vacunados. Para ello se llevó a cabo el marcaje con Ly6G en dos muestras de cada tumor (T1 y T2) y se analizó con citometría. Las gráficas de la figura 21 muestran datos muy dispares del porcentaje de PMN-MDSCs entre las réplicas de T1 (fig. 22A) y de T2 (fig. 22B) y no son concluyentes.



**Figura 22.** Porcentaje de PMN-MDSC sobre el total de células. **A.** Porcentaje de PMN-MDSC en dos réplicas de tumores de ratones vacunados con BCG. **B.** Porcentaje de PMN-MDSC en dos réplicas de tumores de ratones vacunados con BCG.

## 6. DISCUSIÓN

En este trabajo, uno de los objetivos era el estudio la naturaleza de las MDSC asociadas a tumores comparando el fenotipo de las MDSC aisladas de bazo y sitios tumorales de los mismos ratones en comparación con ratones sanos. Ya que sabemos que las MDSCs pueden diferenciarse era importante asegurarnos de que estábamos comparando células con el mismo fenotipo [22] Clasificamos las MDSCs en función de la expresión del marcador de células mieloides CD11b, junto con Ly6G<sup>+</sup> (PMN-MDSC) y Ly6C<sup>+</sup> (M-MDSC).

Durante el análisis de dos modelos de tumores experimentales diferentes, encontramos que en el modelo de adenocarcinoma de pulmón (KC8.1) ambos subconjuntos de MDSC se expandieron, pero en todos los casos la expansión de las PMN-MDSC fue mayor que la del subconjunto monocítico (M-MDSC) [22]. Sin embargo el análisis de expresión de estos mismos marcadores de superficie en el modelo de melanoma (B16F10) no mostró un aumento de estas poblaciones en comparación con el control (ratón sano). De acuerdo a estos resultados, el modelo tumorigénico KC8.1 fue el utilizado para los ensayos de proliferación y supresión.

La actividad supresora de las MDSC se ha asociado con el metabolismo de L - arginina. L-arginina sirve como sustrato para dos enzimas, iNOS (que genera NO) y arginasa 1 (que convierte la L-arginina en urea y L-ornitina). Las MDSC expresan niveles elevados de arginasa-1 y está bien establecido el papel directo de ambas enzimas en la inhibición de la función de las células T [1]. A pesar de esto, no encontramos relación de un aumento de Arg-1 en ratones con melanoma (B16F10) que concuerda que el bajo número de MDSCs que encontramos en este modelo.

Otra característica que se analizó fue la cantidad de células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresaban Granzima B en condiciones tumorales. No encontramos diferencias significativas en la expresión de esta proteína citotóxica en comparación con el control.

Para realizar los estudios de supresión se llevó a cabo, previamente, la puesta a punto de ensayos de proliferación. Los colorantes comerciales de proliferación celular, como Cell Tracker Violet BMQC Dye y CPD se utilizaron para cuantificar las divisiones celulares y rastrear poblaciones celulares. En los ensayos con Cell Tracker no se

observó proliferación, posiblemente el reactivo no estaba en condiciones óptimas para su uso. En el caso de CPD los resultados indicaron que bajo las mismas condiciones que se realizó el ensayo anterior no se observaron signos de proliferación a pesar de que el marcador si penetrara dentro de las células. Cuando se cambiaron las condiciones del cultivo de las células en diferentes placas (ELISA y placa de 96 pocillos de fondo plano) si se observó un aumento de proliferación aunque no en los niveles deseados (10%-40%). Posiblemente coestimuladores como CD3 tuvieron una mejor adhesión a las placas y llevaron a cabo la activación y proliferación de los esplenocitos. Finalmente el uso de CTV mostró niveles de proliferación alrededor del 80% donde además se podían observar las distintas generaciones celulares. Una vez puesto a punto este ensayo se estudió la capacidad supresora de las MDSCs en esplenocitos.

Varios estudios se han esforzado por explicar el desarrollo, la función, la migración y el destino de las MDSC. Un estudio publicado recientemente ha determinado que los precursores mieloides de las MDSC que residen en el bazo se trasladan a los tumores [23]. Nuestros ensayos de supresión mostraron que las MDSC del sitio del tumor y el bazo diferían profundamente en la capacidad de suprimir las células T. La proliferación de esplenocitos no se vio muy afectada al cocultivarlos con bazos ya que exhibió valores del 80%. Sin embargo en el caso de los tumores este porcentaje disminuyó hasta 10-50%. Esto puede ser debido a que las MDSC se acumulan en los órganos linfoides periféricos (bazo) y migran a la zona del tumor donde adquieren su capacidad inmunosupresora. Una posible explicación de estas diferencias podría ser que el microambiente tumoral contiene una gran cantidad de factores supresores diferentes que no están presentes en los bazos. [22]

Partiendo de esta base se analizó el efecto de la vacunación con BCG, en ratones portadores de tumores, sobre las MDSCs. Encontramos que los tumores de ratones vacunados eran considerablemente más pequeños, por eso nuestra hipótesis fue que en los tumores de estos ratones encontraríamos menos MDSCs o con menor capacidad inmunosupresora. Tras los resultados, no podemos decir que en ratones vacunados la supresión sea menor ya que no se han encontrado diferencias en la proliferación de los esplenocitos entre ellos y los no vacunados. Tampoco tenemos datos concluyentes de

que el número de MDSCs sea menor en vacunados. Serán necesarios experimentos de más exhaustivos para aclarar esta cuestión.

Por tanto, con nuestros datos y en contra de nuestra hipótesis, que el tumor en estos ratones vacunados sea menor no está relacionado con un menor número de MDSCs o con menor capacidad supresora, será debido a otros factores ya que en este tipo de órganos se pueden encontrar una gran variedad de células mieloides distintas (macrófagos, neutrófilos etc.).

## 7. CONCLUSIONES

La información proporcionada por los resultados obtenidos en este trabajo ha llevado a plantear las siguientes conclusiones:

- El uso del modelo tumorigénico KC8.1 para la caracterización de MDSCs provocó una expansión de la población de células mieloides inmaduras, siendo el subconjunto PMN-MDSCs las mayoritarias en todos los casos.
- No encontramos un aumento en la expresión de Arginasa-1 por parte de las MDSCs en condiciones tumorales como marcador de supresión.
- CTV es el marcador celular que mejor funcionó para marcar los esplenocitos y que nos permitió poner a punto este tipo de ensayos en el laboratorio.
- La supresión de las MDSCs fue mayor a nivel de tumor lo que nos llevó a la conclusión de que estas células migran desde el bazo hacia el tumor y es ahí donde adquieren su capacidad inmunosupresora.
- El empleo de BCG en el modelo de adenocarcinoma de pulmón no produjo una reeducación de las MDSCs editadas por el tumor.



## CONCLUSIONS

The information provided by the results obtained in this work has led to the following conclusions:

- The use of the tumorigenic model KC8.1 for the characterization of MDSCs caused an expansion of the population of immature myeloid cells, mostly the PMN-MDSC subset.
- We did not find an increase in the expression of Arginase-1 by MDSC as a marker of suppression under tumor conditions.
- CTV is the cell marker that worked best to mark splenocytes and that allowed us to develop this type of assay in the laboratory.
- The suppression of MDSCs was greater at the tumor level, which led us to conclude that these cells migrate from the spleen to the tumor where they acquire their immunosuppressive capacity.
- The use of BCG in the lung adenocarcinoma model did not produce a re-education of the MDSCs edited by the tumor.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Talmadge, J. E. and Gabrilovich, D. I. (2013) 'History of myeloid-derived suppressor cells', *Nature Reviews Cancer*.
2. Wang, Y. *et al.* (2019) 'MDSCs: Key criminals of tumor pre-metastatic niche formation', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2019.00172.
3. Veglia, F., Perego, M. and Gabrilovich, D. (2018) 'Myeloid-derived suppressor cells coming of age review-article', *Nature Immunology*. doi: 10.1038/s41590-017-0022-x
4. Gabrilovich, D. I. and Nagaraj, S. (2009) 'Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system', *Nature Reviews Immunology*. doi: 10.1038/nri2506.
5. Fukumura, D., Kloepper, J., Amoozgar, Z., Duda, D. G. & Jain, R. K. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 325-340, doi:10.1038/nrclinonc.2018.29 (2018)
6. Parker, K. H., Beury, D. W. and Ostrand-Rosenberg, S. (2015) 'Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment', in *Advances in Cancer Research*. doi: 10.1016/bs.acr.2015.04.002.
7. Ostrand-Rosenberg, S. and Fenselau, C. (2018) 'Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment', *The Journal of Immunology*. doi: 10.4049/jimmunol.1701019
8. Kumar, V. *et al.* (2016) 'The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment', *Trends in Immunology*. doi: 10.1016/j.it.2016.01.004.
9. Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. and Bronte, V. (2012) 'Coordinated regulation of myeloid cells by tumours', *Nature Reviews Immunology*. doi: 10.1038/nri3175

10. Zheng, X. *et al.* (2017) 'Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy', *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.17061.
11. Alshetaiwi, H. *et al.* (2020) 'Defining the emergence of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer using single-cell transcriptomics', *Science immunology*. doi: 10.1126/sciimmunol.aay6017
12. Treffers, L. W. *et al.* (2016) 'Neutrophils in cancer', *Immunological Reviews*. doi: 10.1111/imr.12444.
13. Rutkowski, M. R. *et al.* (2015) 'The Tumor Macroenvironment: Cancer-Promoting Networks Beyond Tumor Beds', in *Advances in Cancer Research*. doi: 10.1016/bs.acr.2015.04.011.
14. Redelman-Sidi, G., Glickman, M. S. and Bochner, B. H. (2014) 'The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer-A current perspective', *Nature Reviews Urology*. doi: 10.1038/nrrol.2014.15.
15. Li, R., Gilbert, S. M. and Kamat, A. M. (2020) 'Unraveling the Mechanism of the Antitumor Activity of Bacillus Calmette-Guérin', *European Urology*. doi: 10.1016/j.eururo.2020.08.027
16. Antonelli, A. C. *et al.* (2020) 'Bacterial immunotherapy for cancer induces CD4-dependent tumor-specific immunity through tumor-intrinsic interferon- $\gamma$  signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.2004421117.
17. Pettenati, C. and Ingersoll, M. A. (2018) 'Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer', *Nature Reviews Urology*. doi: 10.1038/s41585-018-0055-4.
18. Inmunoterapia con el bacilo de Calmette-Guérin en el tratamiento del carcinoma superficial de vejiga' (2009) *Revista Mexicana de Urología*.
19. Jax.org. n.d. 004194 - B6.Cg-Tg(*Tcratcrb*)425Cbn/J. [online] Available at: <https://www.jax.org/strain/004194>
20. Téllez Castillo, N. *et al.* (2018) 'Activación de la célula T, alteraciones en el lupus eritematoso sistémico, una revisión narrativa', *Revista Colombiana de Reumatología*. doi: 10.1016/j.rcreu.2017.07.002.

21. McAdam, A. J., A. N. Schweitzer, A. H. Sharpe. *The role of B7 co stimulation inactivation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells*. Immunol.Rev. 1998; 165:231-247.
22. Corzo, C. A. *et al.* (2010) 'HIF-1 $\alpha$  regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment', *Journal of Experimental Medicine*. doi: 10.1084/jem.20100587
23. Park, Y. J. *et al.* (2013) 'Tumor microenvironmental conversion of natural killer cells into myeloid-derived suppressor cells', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0545.